

# Best Available Copy

## Best Available Copy

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平9-503657

(43) 公表日 平成9年(1997)4月15日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z N A	9162-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 38/16	A B A	9051-4C	A 6 1 K 48/00	A E D
38/46	A D U	8615-4C	C 0 7 H 21/04	B
	A D Y	8517-4H	C 0 7 K 14/18	
48/00	A E D	8931-4B	C 1 2 N 7/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 276 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平7-509370  
 (86) (22) 出願日 平成6年(1994)9月15日  
 (85) 翻訳文提出日 平成7年(1995)9月29日  
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 9 4 / 1 0 4 6 9  
 (87) 国際公開番号 W O 9 5 / 0 7 9 9 4  
 (87) 国際公開日 平成7年(1995)3月23日  
 (31) 優先権主張番号 0 8 / 1 2 2 , 7 9 1  
 (32) 優先日 1993年9月15日  
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)  
 (31) 優先権主張番号 0 8 / 1 9 8 , 4 5 0  
 (32) 優先日 1994年2月18日  
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 チロン ビアジーン インコーポレイティ  
 ド  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94608,  
 エミリービル, ホートン ストリート  
 4560  
 (72) 発明者 ダベンスキー, トーマス ダブリュ., ジ  
 ュニア  
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 92014,  
 デルマー, ビア フェリノ 12729  
 (74) 代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組換えアルファウイルスベクター

(57) 【要約】

本発明は、組換え $\alpha$ ウイルスベクターを用いるための組  
 成物及び方法を提供する。

## 【特許請求の範囲】

1. cDNAからインビトロでウイルスRNAの合成を開始させることのできる5'プロモーター、アルファウイルスの転写を開始させることのできる5'配列、アルファウイルス非構造タンパク質をコードするヌクレオチド配列、サブゲノミックフラグメントのウイルス転写が妨げられるように不活性化されたウイルス接合領域そしてアルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列を含むアルファウイルスベクター構成体。

2. cDNAからインビトロでウイルスRNAの合成を開始させることのできる5'プロモーター、アルファウイルスの転写を開始させることのできる5'配列、アルファウイルス非構造タンパク質をコードするヌクレオチド配列、サブゲノミックフラグメントのウイルス転写が減少されるように修正されたウイルス接合領域及びアルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列、を含んで成るアルファウイルス構成体。

3. cDNAからインビトロでウイルスRNAの合成を開始させることのできる5'プロモーター、アルファウイルスの転写を開始させることのできる5'配列、アルファウイルス非構造タンパク質をコードするヌクレオチド配列、サブゲノミックフラグメントのウイルス転写が妨げられるように不活性化された第1のウイルス接合領域、サブゲノミックフラグメントのウイルス転写が減少されるように修正された第2のウイルス接合領域及びアルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列を含んで成るアルファウイルスベクター構成体。

4. cDNAからのウイルスRNAの合成を開始させることができる5'プロモーターとそれに続くアルファウイルスの転写を開始させることのできる5'配列、アルファウイルス非構造タンパク質をコー

ドするヌクレオチド配列、サブゲノミックフラグメントのウイルス転写が妨げられるように不活性化されているか又は活性であるかのいずれかであるウイルス接合領域、アルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列、転写の終了を制御する3'配列、を含んで成るアルファウイルスcDNAベクター構成体。

5. cDNAからのウイルスDNAの合成を開始させることのできる5'プロモータ

一とそれに続くアルファウイルスの転写を開始されることのできる5'配列、アルファウイルス非構造タンパク質をコードするヌクレオチド配列、サブゲノミックフラグメントのウイルス転写が減少されるように修正されたウイルス接合領域、アルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列及び転写の終了を制御する3'配列を含んで成る、アルファウイルスcDNAベクター構成体。

6. cDNAからのウイルスRNAの合成を開始させることのできるプロモーターとそれに続くアルファウイルスの転写を開始させることのできる5'配列、アルファウイルス非構造タンパク質をコードするヌクレオチド配列、サブゲノミックフラグメントのウイルス転写が妨げられるように不活性化された第1のウイルス接合領域とそれに続くサブゲノミックフラグメントのウイルス転写が減少されるように修正された第2のウイルス接合領域、アルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列及び転写の終了を制御する3'配列、を含んで成るアルファウイルスcDNAベクター構成体。

7. 前記アルファウイルスがアウウイルス、ベネズエラマ脳炎ウイルス、ロス・リバーウイルス、セムリキ森林ウイルス及びマヤロウイルスから成るグループの中から選択されている、請求の範囲第1項～第6項に記載のベクター構成体。

8. 前記アルファウイルスがシンドビスウイルスである請求の範囲第1項～第6項に記載のベクター構成体。

9. 非相同配列を含む、請求の範囲第1項～第6項に記載のベクター構成体。

10. 100以上の塩基の非相同ヌクレオチド配列を含む、請求の範囲第9項に記載のベクター構成体。

11. 3 kb以上の非相同ヌクレオチド配列を含む、請求の範囲第9項に記載のベクター構成体。

12. 5 kb以上の非相同ヌクレオチド配列を含む、請求の範囲第9項に記載のベクター構成体。

13. 8 kb以上の非相同ヌクレオチド配列を含む、請求の範囲第9項に記載のベクター構成体。

14. 前記選択された非相同配列が、IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15,  $\gamma$ -IFN, G-CSF及びGM-CSFから成るグループの中から選択されたタンパク質をコードする配列である、請求の範囲第9項に記載のベクター構成体。

15. 前記選択された非相同配列が、インフルエンザウイルス、HPV, HBV, HCV, EBV, HIV, HSV及びCMVから成るグループの中から選択されたウイルスから得られる、請求の範囲第9項に記載のベクター構成体。

16. HPVから得られる非相同配列が、E5, E6, E7及びL1から成るグループの中から選択されている、請求の範囲第15項に記載のベクター構成体。

17. 前記選択された非相同配列が、HIV gp 120及びgagから成るグループの中から選択されたHIVタンパク質をコードする、請求の範囲第9項に記載のベクター構成体。

18. 前記選択された非相同配列がアンチセンス又はリボザイム配列である、請求の範囲第9項に記載のベクター構成体。

19. 前記アンチセンス配列が、インフルエンザウイルス、HPV, HBV, HCV, HIV, HSV及びCMVをコードする配列から成るグループの中から選択されている、請求の範囲第18項に記載のベクター構成体。

20. アルファウイルス構造タンパク質を全く含んでいない、請求の範囲第1項～第6項に記載のベクター構成体。

21. 選択された非相同（配列）が前記ウイルス接合領域から下流に位置づけられている、請求の範囲第1項、第2項、第4項又は第5項に記載のベクター構成体。

22. 選択された非相同配列が前記第2のウイルス接合領域から下流に位置づけされている、請求の範囲第3項又は第6項に記載のベクター構成体。

23. 前記ウイルス接合領域に続いて位置づけされているポリリンカーをさらに含んで成る、請求の範囲第21項に記載のベクター構成体。

24. 前記ポリリンカーが野生型アルファウイルス制限エンドヌクレアーゼ認識



配列を含まない、請求の範囲第21項に記載のベクター構成体。

25. 前記選択された非相同配列が、アルファウイルス非構造タンパク質をコードする前記ヌクレオチド配列内に位置づけられている、請求の範囲第9項に記載のベクター構成体。

26. 前記ウイルス接合領域がヌクレオチド番号7579～ヌクレオチド7597までの図1に示されているようなヌクレオチド配列から成る、請求の範囲第1項又は第4項に記載のベクター構成体。

27. 前記第2のウイルス接合領域から下流に位置づけされたE3アデノウイルス遺伝子をさらに含んで成る、請求の範囲第3項又は第6項に記載のベクター構成体。

28. 前記第1のウイルス接合領域と前記第2のウイルス接合領域の間に位置づけられたレトロウイルスパッケージング配列をさらに含んで成る請求の範囲第3項及び第6項に記載のベクター構成体。

29. 機能的ウイルス接合領域を含まない分離された組換え型アルファウイルスベクター。

30. サブゲノミックフラグメントの減少したウイルス転写を生成する分離された組換え型アルファウイルスベクター。

31. 1つのプロモーター及び単数又は複数のアルファウイルス構造タンパク質を含み、このプロモーターがこのアルファウイルス構造タンパク質の発現を導くことのできるものである、発現カセット。

32. 前記アルファウイルス構造タンパク質がアルファウイルスカプシドタンパク質である、請求の範囲第31項に記載の発現カセット。

33. 前記アルファウイルス構造タンパク質がシンドビス構造タンパク質6K、E3、E2及びE1から成るグループの中から選択される、請求の範囲第31項に記載の発現カセット。

34. プロモーター、単数又は複数のアルファウイルス構造タンパク質及び非相同リガンド配列を含み、このプロモーターは前記アルファウイルス構造タンパク質及び前記非相同配列の発現を導くことのできるものである、発現カセット。

35. 前記非相同リガンド配列が、VSVG, HIV gp 120及びCD4から成るグループの中から選択されている、請求の範囲第34項に記載の発現カセット。

36. 前記プロモーターが、MuLV, MMTV、アルファウイルス接合領域、CMV及びVA1 RNAから成るグループの中から選択されている、請求の範囲第31項～第35項に記載の発現カセット。

37. 標的細胞内への導入の時点で、感染後少なくとも72時間生存可能な感染細胞を産生するアルファウイルス粒子。

38. アルファウイルス粒子の感染後、少なくとも72時間生存可能である標的細胞。

39. ポリ-Aテイルをさらに含んで成る、請求の範囲第1項～第3項に記載のベクター構成体。

40. 標的細胞内への導入の時点で、感染後少なくとも72時間生存可能である感染細胞を産生する組換え型アルファウイルス粒子において、アルファウイルス粒子での感染を受けた標的細胞内で少なくとも1つの抗原又はその修正された形態の発現を導くベクター構成体をも支持しており、この抗原又はその修正された形態が動物の体内で免疫応答を刺激できるものである、組換え型アルファウイルス。

41. 発現された抗原が細胞媒介型免疫応答を惹起する、請求の範囲第40項に記載の組換え体粒子。

42. 発現された抗原がHLAクラスI制限免疫応答を惹起する、請求の範囲第40項に記載の組換え型アルファウイルス粒子。

43. 発現された抗原がさらにHLAクラスII制限免疫応答を惹起する、請求の範囲第40項に記載の組換え型アルファウイルス。

44. アルファウイルス粒子での感染を受けた細胞内での緩和剤の発現を導くことのできるベクター構成体を支持する組換え型アルファウイルス粒子において、前記緩和剤は病原性にとって必要な病原性作用物質の機能を阻害することのできるものである、組換え型アルファウイルス粒子。

45. 病原性作用物質がウイルスであり、阻害される機能は、感染を受けた細胞

からのウイルスの退出、吸着、複製、遺伝子発現、アッセンブリーから成るグループの中から選択されている、請求の範

囲第44項に記載の組換え型アルファウイルス粒子。

46. 病原性作用物質がガン性細胞又はガン促進成長因子であり、阻害される機能し、生存可能性、細胞複製、外部シグナルに対する変化した感受性、及び抗オシコ遺伝子の産生又はその突然変異形態の産生の欠如から成るグループの中から選択されている、請求の範囲第44項に記載の組換え型アルファウイルス粒子。

47. 病原性作用物質と結びつけられた1つの実体がその細胞内に存在することに応答して、この感染した標的細胞内での毒性緩和剤の発現を導く、請求の範囲第44項に記載の組換え型アルファウイルス粒子。

48. 緩和剤が病原性遺伝子の発現を選択的に阻害することのできるものである、請求の範囲第44項に記載の組換え型アルファウイルス粒子。

49. 緩和剤が、病原性作用物質により産生されたタンパク質の活性を阻害できるものである、請求の範囲第44項に記載の組換え型アルファウイルス粒子。

50. 緩和剤が、病原性のために必要であるRNA配列に対し相補的なアンチセンスRNAを含んでいる、請求の範囲第44項に記載の組換え型アルファウイルス粒子。

51. 緩和剤が、病原性にとって必要なRNA配列に対し相補的なセンスRNAを含ん

でいる、請求の範囲第44項に記載の組換え型アルファウイルス粒子。

52. 緩和剤が、病原性作用物質の欠陥構造タンパク質を含み、このタンパク質が病原性作用物質のアッセンブリーを阻害できるものである、請求の範囲第44項に記載の組換え型アルファウイルス粒子。

53. 病原性作用物質の活性阻害物質へとそうでなければ不活性で

ある前記物質を活性化することのできる遺伝子産物の発現を導く、請求の範囲第

44項に記載の組換え型アルファウイルス粒子。

54. ヘルペスチミジンキナーゼ遺伝子産物の発現を導く、請求の範囲第44項に記載の組換え型アルファウイルス粒子。

55. 病原性RNA分子に特異的なリボザイムとして機能するRNA分子の発現を導く、請求の範囲第43項に記載の組換え型アルファウイルス粒子。

56. 前記シンドビスウイルスでの感染を受けた標的細胞内で免疫系の単数又は複数の要素を抑制することのできる遺伝子の発現を導く、組換え型アルファウイルス粒子。

57. レトロウイルスでの感染を受けた標的細胞内で少なくとも1つの抗原又はその修正された形態の発現を導く組換え型アルファウイルス粒子で、感受性ある標的細胞を感染させることを含み、前記抗原又はその修正された形態が動物の体内での免疫応答を刺激することのできるものである、抗原に対する免疫応答を刺激する方法。

58. 標的細胞はインビボで感染を受ける、請求の範囲第57項に記載の方法。

59. 発現された抗原がHLAクラスI-制限免疫応答を惹起する、請求の範囲第57項に記載の方法。

60. 発現された抗原がさらにHLAクラスII-制限免疫応答を惹起する、請求の範囲第57項に記載の方法。

61. 発現された抗原がHIVタンパク質又はその修正された形態である、請求の範囲第57項に記載の方法。

62. 標的細胞を感染させる段階の前又は後に、クラスI又はクラスIIのMHCタンパク質又はその組合せ或いはCD3, ICAM-1, LFA-3又はその類似体から成るグループの中から選択されたタンパク質のいずれかをコードする核酸分子で標的細胞を感染させることを含む、

請求の範囲第57項に記載の方法。

63. アルファウイルス粒子の感染を受けた細胞内で緩和剤の発現を導く組換え型アルファウイルス粒子で、感受性ある標的細胞を感染させることを含み、この緩和剤が病原性にとって必要な病原性作用物質の機能を阻害できるものである、病原性作用物質を阻害する方法。

64. 病原性作用物質がガン性細胞又はガン促進成長因子であり、阻害される機能が、生存可能性、細胞複製、外部シグナルに対する変性した感受性及び抗オン

コ遺伝子の産生の欠如から成るグループの中から選択されたものである、範囲第63項に記載の方法。

65. 病原性作用物質と結びつけられた実体が感染標的細胞の中に存在することに応答して、シンドビス粒子がこの細胞内の毒性緩和剤の発現を導く、範囲第63項に記載の方法。

66. 緩和剤には、病原性にとって必要なRNA配列に対して相補的なアンチセンスRNAが含まれる、範囲第63項に記載の方法。

67. 緩和剤には、病原性にとって必要なRNA配列に対して相補的なセンスRNAが含まれる、範囲第63項に記載の方法。

68. 緩和剤には病原性作用物質の欠陥構造タンパク質が含まれており、このタンパク質が病原性作用物質のアッセンブリーを阻害できるものである、範囲第63項に記載の方法。

69. シンドビス粒子が、病原性作用物質の活性阻害物質へとそうでなければ不活性な前駆物質を活性化させることができる遺伝子産物の発現を導く、範囲第63項に記載の方法。

70. シンドビス粒子がヘルペスチミジンキナーゼ遺伝子産物の発現を導く、範囲第63項に記載の方法。

71. シンドビス粒子が、その感染を受けかつ病原性作用物質を含む標的細胞の表面上で、リポーティング産物を発現する、範囲第63

項に記載の方法。

72. アルファウイルス粒子の感染を受けた細胞内での遮断要素の発現を導く組換え型アルファウイルス粒子で感受性標的細胞を感染させることを含み、ここでこの遮断要素はレセプタ／作用物質の相互作用が遮断されるようにレセプター又は作用物質に対し結合できるものである、1つの細胞に結びつけられたレセプタに対する作用物質の結合を阻害する方法。

73. 請求の範囲第41項～第57項のいずれかに記載のアルファウイルス粒子の感染を受けた半ピボ細胞。

74. レトロウイルス構成体を支持するアルファウイルス粒子の感染を受けた半

ピボ細胞。

75. 生理学的に受容可能な担体又は希釈剤と組合わせた形で、請求の範囲第41項～第57項のいずれか1項に記載のアルファウイルス粒子を含む薬学組成物。

76. アルファウイルス粒子を産生するパッケージング細胞系統。

77. アルファウイルス粒子を産生する哺乳動物パッケージング細胞系統。

78. アルファウイルス粒子を産生する哺乳動物でないパッケージング細胞系統。

79. アルファウイルス粒子を産生する昆虫パッケージング細胞系統。

80. 前記昆虫パッケージング細胞が蚊パッケージング細胞である、請求の範囲第79項に記載のパッケージング細胞系統。

81. パッケージング細胞系統が、ベクター構成体の導入時点で、ヒト細胞を感染させることのできるシンドビス粒子を産生する、請求の範囲第80項に記載のパッケージング細胞系統。

82. アルファウイルスベクターのパッケージング及び産生に適し

たレトロウイルスパッケージング細胞系統。

83. シンドビス阻害遺伝子を発現することのできる発現ベクターをさらに含む、請求の範囲第76項～第82項のいずれか1項に記載のパッケージング細胞系統。

84. 組換え型アルファウイルス粒子を産生することのできるアルファウイルス産生者細胞系統。

85. 自律的にであるか又は単数又は複数の要因に応答して細胞内で複製することのできる非相同ヌクレオチド配列及び転写終了配列を発現することのできる構成体である、5'プロモーターを含む、真核性重層ベクター開始系。

86. 自律的にであるか又は単数又は複数の要因に応答して細胞内で複製することのできる非相同RNA配列及び転写終了配列を発現することのできる構成体である、5'プロモーターを含むDNA真核性重層ベクター開始系。

87. 単数又は複数の非相同ヌクレオチド配列を発現することのできる前記構成体がシンドビスcDNAベクター構成体である、請求の範囲第85項及び第86項に記載の真核性重層ベクター開始系。

88. 前記構成体が、ポリオウイルス、ライノウイルス、ポックスウイルス、レトロウイルス、インフルエンザウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、SV40ウイルス、HIV、はしかウイルス、アストロウイルス、セムリキ森林熱ウイルス及びコロナウイルスから成るグループの中から選択されたウイルスベクター構成体であ、請求の範囲第85項及び第86項に記載の真核性重層ベクター開始系。

89. さらにポリアデニル化配列を含む、請求の範囲第85項及び第86項に記載の真核性重層ベクター開始系。

90. 温血動物に対して、請求の範囲第85項～89項のいずれか1項に記載の真核性重層ベクター開始系を投与することを含んで成る、温血動物に対して非相同性ヌクレオチド配列を送り出すための方法。

## 【発明の詳細な説明】

### 組換えアルファウイルスベクター

#### 技術分野

本発明は、一般的にはベクターとしての組換えウイルスの使用、さらに詳しくは、標的細胞中で異種配列 (heterologous sequence) を発現することができる シンドビスウイルス (Sindbis virus) のような組換えアルファウイルス (alpha virus) に関する。

#### 発明の背景

アルファウイルスはトガウイルス科の一群の血清学的に関連した節足動物に運搬されるウイルスよりなる。簡単に説明すると、アルファウイルスは全世界に分布しており、自然界では蚊から脊椎動物へのサイクルを介して存在する。鳥、齧歯類、馬、霊長類およびヒトは、アルファウイルス脊椎動物病原体保有者／宿主として指定されているものの仲間である。

血球凝集阻害 (HI) 測定法を用いて、アルファウイルス属内で、26の公知のウイルスおよびウイルスサブタイプが分類されている。簡単に説明すると、HI試験は26のアルファウイルスを3つの大きな群 (complex) に分離する [ベネズエラ脳炎 (Venezuelan encephalitis) (VE) 群、セムリキ森林 (Semliki Forest) (SF) 群、そしてウェスタン脳炎 (western encephalitis) (WE) 群]。さらにHI血清学的測定法に基づき、さらに4つのウイルス [イースタン脳炎 (EE)、バーマ森林 (Barmah Forest)、ミドルバーグ (Middleburg)、およびヌヅム (Ndumu)] が、それぞれ分類されている。

アルファウイルス属のメンバーはまた、ヒトでの相対的な臨床的

特徴に基づき分類される [主に脳炎に関連するアルファウイルス、そして主に発熱、発疹そして多発性関節炎に関連するアルファウイルス]。前者の群に含まれるのは、VE、WEおよびEE群である。一般的にこの群による感染は永続的な後遺症 (例えば行動変化や学習無能力、または死) に至る。後者の群はSF群であり、各アルファウイルスであるチクングニア (Chikungunya)、オニョン・ニョン (O'nyong-g-nyong)、シンドビス (Sindbis)、ロス・リバー (Ross River)、およびヤマロ



(Mayaro) による。この群に関しては重大な流行病が報告されているが、感染は一般に自己制限式であり、永続的な後遺症はない。

シンドビスウイルスは、トガウイルス科のアルファウイルス属の原型である。

シンドビスウイルスの臨床症状は通常は明確ではないが、発熱、関節炎そして発疹がある。シンドビスウイルスは、ヨーロッパ、アフリカ、アジアそしてオーストラリアに分布しており、ほとんどの流行病データは南アフリカから得られ、ここでは人口の20%は血清反応陽性である。(総説については、Peters and Dalrymple, Fields Virology (第2版)、Fieldsら編、B. N. Raven Press、ニューヨーク、ニューヨーク州、第26章、pp. 713-762を参照)。感染症シンドビスウイルスは、ウガンダでの大発生中と、中央アフリカの1つの症例からのみのヒトの血清から単離されている。

アルファウイルス属の形態と形態発生は一般に非常に均一的である。特にエンベロープのある60-65nm粒子は、ほとんどの脊椎動物細胞に感染し、増殖性感染は細胞変性作用がある。一方非脊椎動物細胞(例えば、蚊の細胞)の感染では、顕著な細胞変性が現れない。典型的にはアルファウイルスはBHK-21細胞またはベロ(Vero)細胞で増殖し、増殖は急速であり、感染後24時間以内に最大収率に達する。フィールド株は、通常発達第1段階の鳥類の胎児(例えばヒヨコ)から単離される。

ヒヨコ) 繊維芽細胞の培養物から単離される。

アルファウイルスのゲノムRNA (49S RNA) は断片に分かれてはおらず、明確な極性を有し、長さは約11-12kbであり、5' キャップと3' ポリアデニル化テールを有する。感染性のエンベロープで覆われたウイルスは、細胞質中でウイルスのゲノムRNA上にウイルスのヌクレオカプシッド蛋白が組み込まれ、ウイルスにコードされた糖蛋白が埋め込まれた細胞膜から発芽することにより産生される。細胞内へのウイルスの侵入は、カテリン(catherin)で被覆されたくぼみへのエンドサイトーシス、ウイルス膜とエンドソームとの融合、ヌクレオカプシッドの放出そしてウイルスゲノムの脱外皮により起きる。ウイルスの複製の間、ゲノム性49S RNAは、相補的な負の鎖の合成の鋳型として作用する。この負の鎖は次に、ゲノムRNAの鋳型、そして内部的にイニシエート(initiate)された26Sサブゲ

ノムRNAの鋳型として作用する。この非構造蛋白はゲノムRNAから翻訳される。アルファウイルス構造蛋白は、サブゲノム26S RNAから翻訳される。すべてのウイルス遺伝子は、ポリ蛋白として発現され、翻訳後の蛋白分解により各蛋白に処理される。

ヒトを治療するために組換えアルファウイルスベクターを使用するには、組換えウイルスの感染性と生存性 (viability) が保持されるように、目的の温度で長期間運搬され保存することができなければならない。組換えウイルスの現在の保存方法は、一般に液体として低温で保存する。この方法は、通常十分な冷蔵能力を有さない第3世界では問題である。例えば、アフリカでは毎年何万人もの子供が麻疹のような感染性疾患により死んでいる。冷房手段が容易に利用できないこれらの国の大部分では、これらの疾患の防止に必要なワクチンを分配することができない。

液体としてそして低温で保存されることに加えて、現在のウイル

ス調製物はしばしば、患者への注射には好ましくない培地成分を含有する。従って当該分野には、精製された組換えウイルスベクター（特にアルファウイルスベクター）を凍結乾燥の形で高温で保存する方法、かつこれが患者への注射に適した形であることに対するニーズがある。

本発明は、種々の用途（例えば、遺伝子療法）での使用に適し、かつ他の関連する利点を与える組換えアルファウイルスベクターを開示する。

#### 発明の要約

簡単に説明すると、本発明はアルファウイルスベクター作成体およびアルファウイルス粒子、そしてこの作成方法と使用方法を提供する。本発明のは1つの面において、インビトロでcDNAからウイルスRNAの合成を開始することができる5'プロモーター、アルファウイルスの転写を開始することができる5'配列、アルファウイルスの非構造蛋白をコードするヌクレオチド配列、サブゲノム断片のウイルス転写を防止するように不活性化されたウイルス結合領域、そしてアルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列よりなる、アルファウイルスベクター作成体が提供される。本発明の別の面において、サブゲノム断片のウイルス転写が低

下するように修飾されたウイルス結合領域が提供される。

本発明のさらに別の面において、インビトロでcDNAからウイルスRNAの合成を開始することができる5'プロモーター、アルファウイルスの転写を開始することができるcDNA 5'配列からインビトロでウイルスRNAの合成を開始することができる5'プロモーター、アルファウイルスの非構造蛋白をコードするヌクレオチド配列、サブゲノム断片のウイルス転写を防止するように不活性化された第1

のウイルス結合領域、サブゲノム断片のウイルス転写が低下するように修飾された第2のウイルス結合領域、そしてアルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列よりなる、アルファウイルスcDNAベクター作成体が提供される。

本発明の別の面において、インビトロでcDNAからウイルスRNAの合成を開始することができる5'プロモーター、cDNAからウイルスRNAの合成を開始することができる5'プロモーター、その後続くアルファウイルスの転写を開始することができる5'配列、アルファウイルスの非構造蛋白をコードするヌクレオチド配列、サブゲノム断片のウイルス転写が低下するように修飾されたウイルス結合領域、アルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列、そして転写の停止を制御する3'配列よりなる、アルファウイルスcDNAベクター作成体が提供される。

本発明の別の面において、cDNAからウイルスRNAの合成を開始することができる5'プロモーター、その後続くアルファウイルスの転写を開始することができる5'配列、アルファウイルスの非構造蛋白をコードするヌクレオチド配列、サブゲノム断片のウイルス転写が低下するように不活性化されたウイルス結合領域、アルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列、そして転写の停止を制御する3'配列よりなる、アルファウイルスcDNAベクター作成体が提供される。

本発明のさらに別の面において、cDNAからウイルスRNAの合成を開始することができる5'プロモーター、その後続くアルファウイルスの転写を開始することができる5'配列、アルファウイルスの非構造蛋白をコードするヌクレオチド配列、サブゲノム断片のウイルス転写を防止するように不活性化された第1のウイルス結合領域、その後続くサブゲノム断片のウイルス転写が低下するように

修飾された第2のウイルス結合領域、アルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列よりなる、そして転写の停止を制御する3'配列よりなる、アルファウイルスcDNAベクター作成体が提供される。

1つの実施態様において、上記のベクター作成体は異種配列を含有する。典型的にはそのようなベクター作成体は、100塩基より大きい異種ヌクレオチド配列を含有し、一般的には異種ヌクレオチド配列は3 kbより大きく、好ましくは異種ヌクレオチド配列は5 kbより大きく、さらに好ましくは異種ヌクレオチド配列は8 kbより大きい。種々の実施態様において、異種配列はIL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15,  $\alpha$ ,  $\beta$  および  $\gamma$ -IFN, G-CSF, および GM-CSF よりなる群から選択される蛋白をコードする配列である。

さらに別の実施態様において上記ベクター作成体は、インフルエンザウイルス、HPV, HBV, HCV, EBV, HIV, HSV, FeLV, FIV、ハンタウイルス (Hanta virus)、HTLV I, HTLV IIそしてCMVよりなる群から選択されるウイルスからの、選択された異種配列を含む。本発明の1つの好適な実施態様において、HPVから得られる異種配列は、E5, E6, E7およびL1よりなる群から選択される蛋白をコードする。

さらに別の実施態様において上記のベクター作成体は、HIV gp120およびgagよりなる群から選択されるHIV蛋白をコードする、選択された異種配列を含む。

上記の選択された配列は、アンチセンス配列であってよい。好適な実施態様において、アンチセンス配列はインフルエンザウイルス、HPV, HBV, HCV, EBV, HIV, HSV, FeLV, FIV、ハンタウイルス (Hanta virus)、HTLV I, HTLV IIおよびCMVよりなる群から選択され

る。

別の実施態様において、上記のベクター作成体はアルファウイルス構造蛋白を含有しない。別の実施態様において、選択された異種配列はウイルス結合領域の下流に位置する。第2のウイルス結合を有する上記のベクター作成体において、選択された異種配列はいくつかの実施態様において、第2のウイルス結合領域の

下流に位置してもよい。異種配列がウイルス結合領域の下流に位置する場合、ベクター作成体はさらにウイルス結合領域に続いて位置するポリリンカーを含有してもよい。好適な実施態様において、このようなポリリンカーは野生型アルファウイルスのウイルス制限エンドヌクレアーゼ認識配列を含有しない。

さらに別の実施態様において、上記のベクター作成体中で、選択された異種配列はアルファウイルス非構造蛋白をコードするヌクレアーゼ配列内に位置してもよい。

具体的な実施態様において上記ベクター作成体は、ヌクレオチド番号7579からヌクレオチド番号7597までの図1に示すヌクレオチド配列（配列番号1）よりなるウイルス結合領域を含む。ベクター作成体が第2のウイルス結合を含む別の実施態様においてベクター作成体は、第2のウイルス結合領域の下流に位置するE3アデノウイルス遺伝子を含有し、またさらに第1のウイルス結合領域と第2のウイルス結合領域の間に位置するレトロウイルスパッケージング配列よりなる。

さらなる面において、本発明は、機能性ウイルス結合領域を含まず、好適な実施態様ではサブゲノム断片のウイルス転写の低下を示す単離された組換えアルファウイルスベクターを提供する。

さらに別の面において本発明は、プロモーターと1つまたはそれ以上のアルファウイルス構造蛋白（プロモーターは、アルファウイルス構造蛋白の発現を指令することができる）よりなる発現カセットを提供する。

種々の実施態様において発現カセットは、アルファウイルスカプシッド蛋白（例えば、6K、E3、E2およびE1よりなる群から選択されるシンデビス構造蛋白）を発現することができる。

さらに別の面において本発明は、プロモーター、1つまたはそれ以上のアルファウイルス構造蛋白、および異種リガンド配列（プロモーターはアルファウイルス構造蛋白と異種配列の発現を指令することができる）よりなる発現カセットを提供する。種々の実施態様において、異種リガンド配列は、VSVG、HIV gp120、抗体、インスリン、およびCD4よりなる群から選択される。

ある実施態様において、上記の発現カセットは、MuLV、MMTV、アルファウイルス結合領域、CMVおよびVAIRNAよりなる群から選択されるプロモーターを含む。

さらに別の面において本発明は、標的細胞に導入されると、感染後少なくとも72時間は生存している感染細胞を産生するアルファウイルス粒子を提供する。また本発明のアルファウイルス粒子による感染後少なくとも72時間は生存している標的細胞が提供される。

別の面において、本発明は、標的細胞に導入後、感染後少なくとも72時間は生存している感染細胞を産生する組換えアルファウイルス粒子を提供する（ここでこの粒子はまた、アルファウイルス粒子が感染した標的細胞中の少なくとも1つの抗原またはその修飾された型を有し、その抗原または修飾された型は動物内で免疫応答を刺激することができる）。種々の実施態様において、発現された抗原またはその修飾された型は、細胞性免疫応答、好ましくはHLAクラス I に制限された免疫応答を誘発する。

さらに別の面において本発明は、アルファウイルス粒子で感染し

た細胞内で緩和剤（palliative）の発現を指令することができるベクター作成体を有する組換えアルファウイルス粒子を提供する（ここで緩和剤は、病原性に必要な病原体の機能を阻害することができる）。種々の実施態様において、病原体はウイルス、カビ、原生動物、または細菌であり、阻害される機能は吸収、複製、遺伝子発現、集合、感染細胞からの病原体の排出よりなる群から選択される。他の実施態様において、病原体はガン細胞、癌促進成長因子、自己免疫疾患、心血管系疾患（例えば再狭窄）、骨粗鬆症および男性型禿頭であり、阻害される機能は、細胞の生存性や細胞複製よりなる群から選択される。さらなる実施態様においてベクター作成体は、感染した標的細胞中の病原体に関連した物質の存在に応答して、そのような細胞中の毒性緩和剤の発現を指令する。緩和剤は、好ましくは病原性遺伝子の発現を選択的に阻害、または病原体により産生される蛋白の活性を阻害することができる。さらに別の実施態様において緩和剤は、ウイルスプロテアーゼに特異的な阻害性ペプチド、病原性に必要なRNA配列に相補的なアンチセンスRNA、病原性に必要なRNA配列に相補的なセンスRNA、または病原体の

欠陥のある構造蛋白（このような蛋白は病原体の集合を阻害することができる）よりなる。

さらに別の実施態様において、緩和剤の発現を指令する上記のアルファウイルス粒子は、さらに詳しくは病原体の不活性な前駆体を活性な阻害剤に活性化することができる遺伝子生成物（例えば、ヘルペスチミジンキナーゼ遺伝子生成物、癌抑制遺伝子、またはほとんどまたは全く細胞毒性のない化合物を病原体の存在下で毒性生成物に活性化する、従って病原体に対して局所的治療法を与える蛋白）の発現を指令する。あるいはアルファウイルス粒子は、病原体由来の蛋白による処理または修飾に対して毒性である蛋白、アルファウイルス粒子が感染した細胞中の細胞蛋白、または細胞蛋白の発現を指令する遺伝子生成物、アルファウイルスに感染した蛋白の表面のレポーティング生成物、または病原性RNA分子に特異的なアンチセンスまたはリボザイムとして機能するRNA分子の発現を指令する。

いくつかの実施態様において、上記のアルファウイルスにおいて蛋白はヘルペスチミジンキナーゼまたはCD4である。

さらに別の面において本発明は、アルファウイルスが感染した標的細胞中の免疫系の1つの以上の成分を抑制することができる遺伝子の発現を指令するアルファウイルス粒子、そしてシンドビスウイルスが感染した細胞中の阻止成分の発現を指令するアルファウイルス粒子（ここで阻止成分は、リセプターまたは病原体に結合してリセプター／病原体相互作用を阻止する）を提供する。

さらなる面において本発明は、アルファウイルスが感染した標的細胞中の少なくとも1つの抗原またはその修飾型の発現を指令するアルファウイルス粒子で、感受性のある標的細胞を感染させることによりなる、抗原に対する免疫応答を刺激する方法を提供し、該抗原またはその修飾型は動物の免疫応答を刺激することができる。好適な実施態様において、標的細胞はインビボで感染される。

本発明のさらなる面において、アルファウイルスが感染した標的細胞中の病原性抗原の修飾型を発現を指令するアルファウイルス粒子で、感受性のある標的細胞を感染させることによりなる、病原性抗原に対する免疫応答を刺激する方法が提供され、該修飾抗原は動物の免疫応答を刺激することができるが、病原性抗原に

比較して病原性は低下している。

本発明のさらなる面において、複数のエピトープ（1つまたはそれ以上のエピトープは異なる蛋白に由来する）を有するペプチドの発現を指令するアルファウイルス粒子で、感受性のある標的細胞を感染させることよりなる、抗原に対する免疫応答を刺激する方法が

提供される。

本発明のさらなる面において、ヒトのクラスIまたはクラスII MHC蛋白またはこれらの組合せをコードする核酸配列で、温血動物に関連した感受性のある標的細胞を感染させ、アルファウイルス粒子で感染した標的細胞中の少なくとも1つの抗原またはその修飾型の発現を指令するアルファウイルス粒子で、該細胞を感染させることよりなる、温血動物の免疫応答を刺激する方法が提供され、該抗原またはその修飾型は動物の免疫応答を刺激することができる。

本発明の別の面において、アルファウイルス粒子で感染した細胞中の緩和剤の発現を指令するアルファウイルス粒子で感受性のある標的細胞を感染させることよりなる、病原体を阻害する方法が提供され、該緩和剤は病原性に必要な病原体の機能を阻止することができる。

本発明の他の面において、真核細胞重層ベクターイニシエーション系（eukaryotic layered vector initiation systems）が提供される。簡単に説明すると、本発明の1つの実施態様において、真核細胞重層ベクターイニシエーション系は、5'プロモーター、自立的にまたは1つまたはそれ以上の要因に応答して細胞中で複製することができる異種ヌクレオチド配列を発現することができる作成体、および転写停止配列よりなる。別の面において、5'プロモーター、自律的にまたは1つまたはそれ以上の要因に応答して複製することができる異種RNA配列を発現することができる作成体、および転写停止配列よりなる、RNA真核細胞重層ベクターイニシエーション系が提供される。好適な実施態様において、1つまたはそれ以上の異種ヌクレオチド配列を発現することができる作成体は、シンジビスcDNAベクターである。他の実施態様において、作成体はポリオウイルス、ライノウイルス、ポックスウイルス、レトロウイルス、



インフルエンザウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、SV40ウイルス、HIV、麻疹ウイルス、アストロウイルス (Astrovirus)、セムリキ森林ウイルスおよびコロナウイルスよりなる群から選択されるウイルスベクターである。さらなる実施態様において、真核細胞重層ベクターイニシエーション系はさらなるポリアデニル化配列よりなる。

さらに別の面において本発明は、標的細胞中で緩和剤の発現を指令することができる、上記のアルファウイルスRNAベクター分子を提供する。このアルファウイルスRNA発現ベクター形状中の緩和剤は、発現される時、アルファウイルス粒子の上記の面と同様の効果を示す。アルファウイルスRNA発現ベクターは順に、アルファウイルスウイルスの転写を開始することができる5'配列、アルファウイルス非構造蛋白をコードするヌクレオチド配列、ウイルス結合粒子、異種配列、アルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列、そして一続きの25の連続ポリアデニル酸残基を含有し、RNA分子として物理的に直接、種々のリボソーム調製物との複合体として、またはアルファウイルスRNAベクター分子、ポリリジンのようなポリ陽イオン化合物、リセプター特異的リガンド、および随時ソラレン不活性化ウイルス (例えば、センダイウイルスまたはアデノウイルス) を含むRNAリガンド複合体として標的細胞中に導入される。

本発明はまた、組換えアルファウイルス粒子の産生に適したパッケージ細胞株およびプロデューサー細胞株を提供する。このようなパッケージ細胞株またはプロデューサー細胞株は、哺乳動物または非哺乳動物 (例えば、蚊の細胞のような昆虫細胞) であってよい。

本発明において広範なアルファウイルスが使用される。代表例としてはオーラ (Aura)、ベネズエラ馬脳炎 (Venezuelan Equine Encephalitis)、フォート・モルガン (Fort Morgan)、セムリキ森林ウイルス (Semliki Forest Virus) およびマヤロ (Mayaro) がある。

本発明のこれらおよび他の面は、以下の詳細な説明と添付の図面を参照することにより明らかになるであろう。さらにいくつかの方法や組成物 (例えば、プラスミド) を詳細に記載している種々の文献を以下に示す。これらの文献は参考の

ためその全体が本明細書中に引用されている。

#### 図面の簡単な説明

図1は、シンドビスウイルスゲノム組成の概略図である。

図2は、RT-PCRによるシンドビスRNAゲノムの増幅法を示す図である。

図3A-Hは、シンドビスより得られる代表的な真核細胞重層ベクターイニシエーション系の配列（配列番号89も参照）を示す。

図4は、シンドビスベーシックベクター（Sindbis Basic Vector）とシンドビスールシフエラーゼベクターの概略図である。

図5は、シンドビスヘルパーベクター作成の図である。

図6は、シンドビスールシフエラーゼベクターの発現とレスキュー（rescue）を示すグラフである。

図7は、シンドビス結合領域を修飾する1つの方法の図である。

図8は、シンドビスパッケージング発現カセットの概略図である。

図9は、LTR/SindIBspE細胞中のシンドビスールシフエラーゼベクターパッケージングを示す棒グラフである。

図10は、シンドビス構造蛋白を発現するためのアストロウイルスまたは他の異種ウイルスの使用法を示す概略図である。

図11は、「RNAループアウト」（“RNA loop-out”）により無能

力化させたウイルス結合領域を活性化する機構の概略図である。

#### 発明の詳細な説明

本発明を説明をする前に、以後使用されるいくつかの用語を定義することが本発明の理解に有用であろう。

「アルファウイルスベクター作成体」とは、目的の配列または遺伝子の発現を指令することのできる集合体を意味する。このベクター作成体は、インビトロでcDNAからウイルスRNAの合成を開始することができる5'プロモーター、アルファウイルスの転写を開始することができる5'配列、および発現された時生物活性のあるアルファウイルス非構造蛋白（すなわち、NSP1, NSP2, NSP3, およびNSP4）をコードする配列、よりなる。さらに本ベクター作成体は、サブゲノム断

片のウイルス転写を防止、阻害または低下するためにいくつかの実施態様において修飾されたウイルス結合領域、およびアルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列を含有する。本ベクター作成体はまた、生存ウイルスの産生を可能にするのに十分なサイズの核酸分子、および1つまたはそれ以上の制限部位も含有してもよい。アルファウイルスベクター作成体がcDNAベクター作成体の時、これは、cDNAからウイルスRNAの合成を開始することができる5'プロモーター、そして転写停止とスプライス認識を制御する3'配列を、さらに含む。

「発現カセット」は、アルファウイルス構造蛋白を発現することができる組換えで産生される分子を意味する。発現カセットは、プロモーターと、アルファウイルス構造蛋白をコードする配列を含有しなければならない。場合により発現カセットは、転写停止、スプライス認識およびポリアデニル添加部位を含有してもよい。好適なプロモーターにはCMVおよびアデノウイルスVA1RNAプロモーターが

ある。さらに発現カセットは、Neo, SV2 Neo、ヒグロマイシン (hygromycin)、フレオマイシン (phleomycin)、ヒスチジノール (histidinol)、およびDHFRのような選択マーカーを含有してもよい。

「アルファウイルス粒子」は、アルファウイルスベクターを含有するカプシッドを意味する。アルファウイルス粒子の中には、本発明のアルファウイルスベクター作成体を含む種々のベクターが含まれる。好ましくはアルファウイルスカプシッドは、ウイルスにコードされた蛋白が埋め込まれている脂質2重層（例えば細胞膜）内に含有される。

#### A. アルファウイルスの起源

前述のように本発明は、アルファウイルスベクター作成体、そのような作成体を含有するアルファウイルス粒子、およびそのようなベクター作成体と粒子の使用方法を提供する。簡単に説明すると、上記のベクター作成体や粒子の調製に使用するのに適した野生型アルファウイルスをコードする配列は、本明細書で与えられる開示内容により、天然起源、または保管機関（例えば、アメリカンタイプカルチャーコレクション (American Type Culture Collection)、ロックヴィル、メリーランド州）から容易に得られる。

適切なアルファウイルスの代表的な例としては、オーラ (Aura) (ATCC VR-368)、ベバル (Bebaru) ウイルス (ATCC VR-600, ATCC VR-1240)、カバソウ (Cabassou) (ATCC VR-922)、チクングニア (Chikungunya) ウイルス (ATCC VR-64, ATCC VR-124)、イースタン馬脳脊髄炎 (Eastern equine encephalomyelitis) ウイルス (ATCC VR-65, ATCC VR-1242)、フォート・モルガン (Fort Morgan) (ATCC VR-924)、ゲター (Getah) ウイルス (ATCC VR-369, ATCC VR-1243)、キジラガッハ (Kyzylagach) (ATCC VR-927)、マヤロ (Mayaro) (ATCC VR-66)、マヤロウイルス (ATCC VR-1277)、ミドルバーグ (

Middleburg) (ATCC VR-370)、ムカンボ (Mucambo) ウイルス (ATCC VR-580, ATCC VR-1244)、ヌズム (Ndumu) (ATCC VR-371)、ピクスナ (Pixuna) ウイルス (ATCC VR-372, ATCC VR-1245)、ロス・リバー (Ross River) ウイルス (ATCC VR-373, ATCC VR-1246)、セムリキ森林ウイルス (ATCC VR-67, ATCC VR-1247)、シンドビスウイルス (ATCC VR-68, ATCC VR-1248)、トナテ (Tonate) (ATCC VR-925)、トリニチ (Trinititi) (ATCC VR-469)、ウナ (Una) (ATCC VR-374)、ベネズエラ馬脳脊髄炎 (ATCC VR-69)、ベネズエラ馬脳脊髄炎ウイルス (ATCC VR-923, ATCC VR-1250, ATCC VR-1249, ATCC VR-532)、ウェスタン馬脳脊髄炎 (ATCC VR-70, ATCC VR-1251, ATCC VR-622, ATCC VR-1252)、ワタロア (Whataroa) (ATCC VR-926)、および Y-62-33 (ATCC VR-375) がある。

#### B. 野生型シンドビスウイルスをコードする配列

本発明の1つの好適な面において、野生型アルファウイルスをコードする配列はシンドビスウイルスから得られる。特に本発明の1つの実施態様において(および実施例1に詳述されているように)、シンドビスcDNAクローンは、シンドビスウイルスcDNAクローンの5'末端を、バクテリオファージRNAポリメラーゼプロモーターに結合させ、cDNAクローンの3'末端を少なくとも25ヌクレオチドのポリアデノシン (poly A) 系に結合させて得られる。特にウイルスRNA鋳型からの第1のcDNA鎖の合成は、酵素認識配列よりなる連続的配列、25のデオキシチミジンヌクレオチドの配列、およびウイルスの3'末端に相補的な一続きの約18ヌクレオチドを有する3'オリゴヌクレオチドプライマーと、緩衝ヌクレオチド

、酵素認識配列、バクテリオファージプロモーター、およびウイルスの5'末端に相補的な配列を有する5'プロモーターを用いて、行われる。これらのプライマーのそれぞれに存在する酵素認識部位は、互いに異

なり、シンドビスウイルスには見いだされない。さらにバクテリオファージRNAポリメラーゼプロモーターの3'末端に結合している第1のヌクレオチドは、RNAウイルスの真正の第1のヌクレオチドでなければならない。前述の構造を有しユニークなdT:dA 3'末端制限酵素による消化により線状化された、ウイルスcDNAからインビトロで転写されたRNAは、適当な真核細胞への導入の後、cDNAがクローン化される野生型のウイルスによる感染に特徴的な同じ感染サイクルを開始させる。インビトロ転写の後に感染を開始させることができるRNAを与える、このウイルスcDNAクローンは以後「感染性cDNAクローン」と呼ばれる。

#### C. 不活性化ウイルス結合領域を用いる組換えアルファウイルスベクター作成体の産生

前述のように（または、他の供給源から得られるアルファウイルスをコードする配列を用いて）調製された感染性cDNAクローンは、本発明のアルファウイルスベクター作成体を調製するのに直ちに使用することができる。簡単に説明すると、本発明の1つの面において、アルファウイルスの転写を開始することができる5'配列、アルファウイルス非構造蛋白をコードするヌクレオチド配列、サブゲノム断片のウイルス転写が防止されるように不活性化されたウイルス結合領域、そしてアルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列よりなる、組換えアルファウイルスベクター作成体が提供される。後に詳述されるように、不活性化ウイルス結合領域を有するアルファウイルスベクター作成体はサブゲノム断片を転写しないため、広範囲の応用に適している。

##### 1. RNAポリメラーゼプロモーター

前述のように本発明のある実施態様において、インビトロでcDNAからウイルスRNAの合成を開始することができる5'プロモーター

を含有するアルファウイルスベクター作成体が提供される。特に好適な5'プロ

モーターには、RNAポリメラーゼプロモーター(例えばT7, T3およびSP6)がある。

## 2. 転写を開始する配列

前述のように好適な実施態様において、本発明のアルファウイルスベクター作成体は、アルファウイルスの転写を開始することができる5'配列を含有する。そのような配列の代表例としては、野生型シンドビスウイルスのヌクレオチド1-60(図3を参照)、tRNAアスパラギンのヌクレオチド10-75(Schlesingerら、米国特許第5,091,309号)、そして転写を開始する他のトガウイルスからの5'配列がある。

## 3. アルファウイルス非構造蛋白

本発明のアルファウイルスベクター作成体はまた、アルファウイルス非構造蛋白(NSP)をコードする配列を含有する。例として、シンドビスウイルスについては4つのシンドビス非構造蛋白(NSP1, NSP2, NSP3およびNSP4)があり、これらはウイルスが自己増殖できるようにする蛋白をコードする。本発明の1つの実施態様において、非構造蛋白1から3(NSP1~NSP3)は、野生型シンドビスウイルスのヌクレオチド60~5750によりコードされる(図3を参照)。これらの蛋白はポリ蛋白として産生され、後に非構造蛋白NSP1, NSP2、およびNSP3に切断される。1つの実施態様において、NSP4はヌクレオチド5928~7579によりコードされる(図3参照)。

前述の配列以外にアルファウイルスの非構造蛋白をコードする広範囲の配列が本発明において使用できることは、当業者には明白であり、従ってこれらは用語「アルファウイルス非構造蛋白」の範囲内に入ると考えられる。例えば本発明の1つの実施態様において、遺伝子コードの縮重のために2つ以上コドンが特定のアミノ酸をコ

ードする。従って、アルファウイルス非構造蛋白をコードする広範囲の核酸配列が産生される。本発明の他の実施態様において、種々の他の非構造蛋白誘導体(例えば、種々の置換、挿入または欠失が含まれる)が作成されるが、これらは最終的にアルファウイルス非構造蛋白の生物活性を変化させない。本発明において、アルファウイルス非構造蛋白がもしベクター作成体の自己複製を促進するなら

、アルファウイルス非構造蛋白は全体として「生物活性がある」と考えられる。ウイルス性核酸の複製を意味し、感染性ウイルスの産生を意味するのではない自己複製は、ある時間をかけて行われるRNase保護測定法により容易に測定される。そのような誘導体の作成法は、本明細書中の開示内容により当業者は容易に実施できる (Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版)、コールドスプリングハーバーラボラトリープレス (Cold Spring Harbor Laboratory Press) も参照)。

#### 4. ウイルス結合領域

本発明の1つの面において、サブゲノム断片のウイルス転写が防止されるように、アルファウイルスベクター作成体はまた、不活性化されたウイルス結合領域を含有する。簡単に説明すると、アルファウイルスのウイルス結合領域は通常サブゲノム断片の転写開始を制御する。シンドビスウイルスの場合、正常なウイルス結合領域は典型的には、大体ヌクレオチド番号7579で始まり、少なくともヌクレオチド番号7612 (そしておそらくはそれ以上) まで続く。少なくともヌクレオチド7579~7602 (5'-ATC TCT ACG GTG GTC CTA AAT-AGT (配列番号1)) は、サブゲノム断片の転写に必要であると考えられている。この領域(ヌクレオチド7579~7602)は、以後「最小結合領域核」と呼ぶ。

本発明の好適な実施態様において (そして、以下により詳しく説明されるように)、サブゲノム断片のウイルス転写を防止するために、ウイルス結合領域は不活性化されている。本発明での使用において「不活性化」は、RNase保護測定法による測定ではサブゲノム断片の開始点に対応する断片は検出されないことを意味する (代表的な測定法は、Meltonら、Nucleic Acids Res. 12: 7035-7056, 1984; Calzonら、Methods in Enz. 152: 611-632, 1987; およびKekuleら、Nature 343: 457-461, 1990)。

本発明の1つの実施態様において、ウイルス結合領域はヌクレオチド7597で端を切り取る (truncate) することにより、不活性化されている (すなわち、このウイルス結合領域は図3に示すようにヌクレオチド7579~7597の配列よりなる)。この端の切り取り (truncation) によりサブゲノム断片の転写が防止され、さ

らに完全なNSP4領域（ヌクレオチド5928～7579によりコードされる）の合成を可能にする。

本発明の開示より当業者には明らかなように、ウイルス結合領域を不活性化するために広範囲の他の欠失、置換または挿入を行うことができる。例えば本発明の他の実施態様において、ウイルス結合領域はさらにNSP4をコードする領域まで切り取ることができ、これによりNSP4の生物活性を維持しながらサブゲノム断片からのウイルス転写を防止できる。あるいは他の実施態様において、遺伝子コードの重複性のために、NSP4の生物活性を変化させずにサブゲノム断片の転写を防止するような、NSP4をコードする配列のヌクレオチド置換が可能である。

#### 5. アルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列とポリ-Aテール

前述のように本発明のアルファウイルスベクター作成体はまた、アルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列（「アルファウイルスレプリカーゼ認識配列」とも呼ぶ）を含む。簡単に説明するとアル

ファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列は、アルファウイルスが負の鎖の複製を始める認識部位を提供する。アルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列として、広範な配列が使用できる。例えば1つの実施態様において、本発明のシンドビスベクター作成体は、ヌクレオチド11,647～11,703（図3を参照）にコードされるシンドビスポリメラーゼ認識配列を含む。他の実施態様においては、シンドビスポリメラーゼ認識は、認識配列として機能する最小の領域まで端が切り取られている（例えば、図3のヌクレオチド11,684～11,703）。

本発明の好適な実施態様において、ベクター作成体は追加的にポリ-Aテールを含有してもよい。簡単に説明すると、ポリ-Aテールは細胞質中の安定性を促進するのに十分な任意のサイズであり、従ってウイルスの生活史の開始効率を上昇させる。本発明の種々の実施態様において、ポリ-Aテールは少なくとも10アデノシンヌクレオチド、そして最も好ましくは少なくとも25アデノシンヌクレオチドよりなる。

#### D. 他のアルファウイルスベクター作成体

一般的に記載した前述のベクター作成体以外に、本明細書の開示内容を用いて



広範な他のアルファウイルスベクター作成体が調製できる。

### 1. 修飾ウイルス結合領域

本発明の1つの面において、サブゲノム断片のウイルス転写が低下するように、ウイルス結合領域が修飾されたアルファウイルスベクター作成体が提供される。簡単に説明すると、野生型アルファウイルスで細胞を感染すると、通常ウイルス結合領域から開始するサブゲノム断片の多すぎるウイルス転写の結果として細胞が死滅する。この多すぎるRNA分子は、感染細胞の転写機構を破壊し、最終的に細胞を死に至らせることがある。標的細胞の感染が細胞の死ではなく治療効果を示すような好ましい応用（例えば、標的核酸の鎖の切断、または異種蛋白の発現の延長）では、サブゲノム断片のウイルス転写のレベルを低下させ、これによりベクター感染標的細胞の寿命を延長させるために、（前述のベクター作成体の不活性化以外に）アルファウイルスベクター作成体にいくつかの修飾をすることもできる。本発明においては、RNase保護測定法により測定される、ウイルス転写により産生されるサブゲノム断片が標準的野生型アルファウイルス（例えば、シンドビスウイルスATCC番号VR-1248）より少ない場合、そのサブゲノム断片のウイルス転写は「低下している」と見なされる。サブゲノム断片のウイルス転写のレベルを低下させるために、ウイルス結合領域は種々の方法により修飾してもよい。例えば本発明の1つの実施態様においては、遺伝子コードの重複性のために、アミノ酸配列NSP4（または、他の実施態様においてはNSP4の生物活性）に変化を及ぼさずに、サブゲノム断片のウイルス転写のレベルを低下させる、ウイルス結合領域7579～7597でのヌクレオチド置換が行われる。修飾されたベクター作成体が7597を越えてヌクレオチドを含有する場合（例えば、7602または7612まで）、同様の置換がさらに可能であるが、NSP4は7597で停止するためそのような置換は遺伝的重複性に基づく必要はない。修飾されたウイルス結合領域の代表例は、以下の実施例3により詳細に記載される。

### 2. 縦列（tandem）ウイルス結合領域

本発明の別の面において、アルファウイルスの転写を開始することができる5'配列、アルファウイルスの非構造蛋白をコードするヌクレオチド配列、サブゲ

ノム断片のウイルス転写を防止するように不活性化された第1のウイルス結合領域、サブゲノム断片のウイ

ルス転写が低下するように修飾された第2のウイルス結合領域、そしてアルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列よりなる、アルファウイルスベクター作成体が提供される。このようなベクター作成体は、第1の不活性化（または「不能化」）ウイルス結合領域、および第2の修飾（または「合成」）ウイルス結合領域よりなるため、「縦列」（“tendem”ベクター作成体と呼ぶ。本発明の好適な実施態様において、不活性化したウイルス結合領域の後に、直接第2の修飾したウイルス結合領域が続く。

低レベルのサブゲノム転写が好ましい応用例では、最小結合領域核は不活性化した結合領域の下流に縦列で挿入される。目的の効果を得るためにサブゲノム転写のレベルを徐々に上昇させるために、全結合領域に対応する配列を、縦列の結合領域内に徐々に増やしながら追加することができる。

### 3. アデノウイルスE3遺伝子

本発明の別の面において、アルファウイルス感染細胞内のHLA発現をダウンレギュレートするために、第2のウイルス結合領域に続いて縦列のベクター作成体にアデノウイルスE3遺伝子が挿入される。簡単に説明すると、本発明の種々の実施態様において、同一人への遺伝子治療薬の繰り返し接種が好ましい。しかしシンドビスウイルスのようなアルファウイルスの接種の繰り返しは、シンドビスウイルスの非構造蛋白(NSP)に対する特異的抗体または細胞性免疫応答の生成を招くことがある。従って、同一人に繰り返し投与するために、ベクター特異的蛋白に対する宿主の免疫応答を弱める必要がある。

従って本発明の1つの実施態様において、感染細胞の表面に発現される完全な組織適合性抗原の発現をダウンレギュレートするために、アデノウイルス2型初期領域遺伝子3の生成物が使用される。

簡単に説明すると、E3 19,000ダルトン(E3/19K)蛋白は小胞体中のクラスI H-2/HLA抗原に結合して複合体を形成し、クラスI H-2/HLA抗原の完全な

成熟と細胞膜への輸送に必要な末端グリコシル化経路を妨害する。Ad2E3蛋白をコードするアルファウイルスベクターで感染された標的細胞中では、クラス I 抗原内のウイルス非構造蛋白の同時発現は起きない。従って、Ad2E3蛋白を発現するアルファウイルスベクターを、治療用緩和剤の成分として同一人に繰り返し投与することができる。アデノウイルスE3遺伝子の使用の代表例は、以下の実施例4Aに詳述される。

#### 4. CMV H301遺伝子

ウイルスNSPに対する宿主の免疫応答を緩和するために、他の方法を使用することもできる。例えば本発明の別の面において、ベクターで感染した細胞内で発現される特異的蛋白に対する宿主のCTL応答を阻害するために、好ましくは縦列ベクター中の第2のウイルス結合領域のすぐ後に、ヒトサイトメガロウイルス（「HCMV」）H301遺伝子をアルファウイルスベクター作成体内にクローン化される

簡単に説明すると、 $\beta$ 2-ミクログロブリン（ $\beta$ 2m）蛋白は、高等真核生物のクラス I 主要組織適合性分子の $\alpha$ 鎖の $\alpha$ 1、 $\alpha$ 2および $\alpha$ 3のドメインに結合する。 $\beta$ 2mとMHCクラス I 生成物の間の相互作用を妨害すると、感染細胞は細胞毒性T細胞により認識されなくなる。従って実施例4Bに詳述されるように、治療用緩和剤の成分としてのHCMV H301遺伝子生成物の発現は、ウイルスNSPに対する宿主の免疫応答を緩和するために使用することができる。

#### 5. レトロウイルスパッケージング配列

本発明の別の面において、レトロウイルスパッケージング配列が縦列ベクターに挿入され、第1の（不活性化された）ウイルス結合領域と第2のウイルス結合領域と第2の修飾されたウイルス結合領域の間に配置される。簡単に説明すると、レトロウイルスパッケージング配列は、レトロウイルス粒子へのRNAゲノムのパッケージングの信号を送る。以下に詳述されるように、レトロウイルスパッケージング配列は、レトロウイルスパッケージング細胞株を用いてレトロウイルス粒子にアルファウイルスベクターをパッケージングするために使用される。これは、アルファウイルスパッケージング細胞株へのアルファウイルスベクターの移

動効率を上げるために行われる。

## 6. 複数の異種遺伝子の発現

野生型アルファウイルスが感染した細胞内で転写されたmRNAのゲノムの長さとはサブゲノムの長さは、ポリシストロン性であり、それぞれウイルスの4つの非構造蛋白(NSP)と4つの構造蛋白(SP)をコードする。ゲノムmRNAおよびサブゲノムmRNAはポリ蛋白として翻訳され、各非構造蛋白および構造蛋白への処理は、ウイルスにコードされたNSP-およびSP-特異的プロテアーゼに触媒される、翻訳後の蛋白分解性切断により行われる。

本明細書に記載したアルファウイルスベクターのいくつかの応用例では、2つ以上の異種遺伝子の発現が好ましい。例えばゴーシェ症候群 (Gaucher's syndrome) のような代謝性疾患の治療には、治療用緩和剤の持続期間が限定されているため、アルファウイルスベクターまたは粒子の複数回投与が必要である。従って本発明のいくつかの実施態様においては、グルコセルブロシダーゼ遺伝子 (実施例 11を参照) のような緩和剤とともに、標的細胞のAd2e3遺伝子 (実施例 4を参照) を同時発現することが好ましい。しかし野生型ウイルスでは、構造蛋白 (「SP」) ポリシストロン性メッセージは1つのポリ蛋白に翻訳され、これは次にSPにコードされたプロテアーゼにより切断されて個々の蛋白に処理される。従ってSPプロテアーゼ

遺伝子または切断のために認識されるペプチドは、アルファウイルスベクターの置換領域内に存在しないため、ポリシストロン性メッセージからの複数の異種遺伝子の発現は、野生型ウイルスとは異なる機構を必要とする。

従って本発明の1つの実施態様において、適切なシグナルをリボゾームの読通し(readthrough)またはシストロンの間へのリボゾームの侵入により、アルファウイルスベクターが作成される。複数の異種遺伝子を発現する代表的な方法の1つは、以下の実施例 5に記載される。

本発明のさらに別の実施態様において、不能になった結合領域ベクターpKSSIN BVd1JRのすぐ下流へのリボゾームの読み通しまたは内部リボゾームの侵入を促進するシグナルの配置が記載される (実施例 3を参照)。このベクターの形状では

、サブゲノムのメッセージの合成は起こらず、異種蛋白はリボザイムの読み通し（スキヤニング）または内部リボザイム侵入により、ゲノム長さのmRNAから異種蛋白が発現される。野生型に関して、このアルファウイルスベクターによる低レベルのウイルス転写は、感染した標的細胞の寿命を延ばすであろう。

本発明のさらに別の実施態様において、pKSSINBVd1JRsjrまたはpKSSINBVのすぐ下流へのリボゾームの読み通しまたは内部リボゾームの侵入を促進するシグナルの配置が記載される。簡単に説明すると、サブゲノムmRNAの合成はpKSSINBVd1JRsjrまたはpKSSINBVベクターが感染した細胞内で起きるため、これらの2つの異種遺伝子の間へのリボゾームの読み通しまたは内部リボゾームの侵入配列の配置は、サブゲノムmRNAポリシストロン性メッセージによりコードされる両蛋白の翻訳を可能にする。さらにAUG翻訳開始コドンの5'末端に適当な翻訳開始シグナルが存在すれば、追加の異種遺伝子がサブゲノムmRNA領域中に配置される。サブゲノムmRNA領域に挿入され得る異種遺伝子の数は、本明細書に記載する通りにベクターのパッケージングの制限によってのみ限定される。AUG翻訳開始コドンの5'末端に適当な翻訳開始シグナルを有するリボゾームを読み通し、capに無関係の翻訳、または内部リボゾーム侵入を可能にする異なる配列は、上記の構造のシンドピスウイルスベクターpKSSINBVd1JR、pKSSINBV、またはpKSSINBVd1JRsjr中に配置される。これらの翻訳制御配列の起源は、ピコルナウイルスポリおよびEMCV、ヒト免疫グロブリンの重鎖結合蛋白の5'非コード配列、および効率的な翻訳開始のためのコザック(Kozak)コンセンサス配列に一部対応する少なくとも15塩基対の合成配列である。ここでは詳述されないが、翻訳開始に影響するこれらのシグナルは、結合領域の下流、および実施例3に記載の修飾結合領域ベクター中のすべての異種遺伝子の間に配置することができる。

## 7. アルファウイルスcDNAベクター作成体

前述のように本発明はまた、アルファウイルスcDNAベクター作成体を提供する。例えば本発明の1つの面において、cDNAからウイルスRNAの合成を開始することができる5'プロモーター、その後続くアルファウイルスの転写を開始する

ことができる5'配列、アルファウイルス非構造蛋白をコードするヌクレオチド配列、活性であるかまたはサブゲノム断片のウイルス転写が防止されるように不活性化されているウイルス結合領域、アルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列、そして転写停止を制御する3'配列、よりなるアルファウイルスcDNAベクター作成体が提供される。種々の実施態様において、ウイルス結合領域は、サブゲノム断片のウイルス転写が不活性化されるよりもむしろ単に低下するように修飾される。別の実施態様において、第2のウイルス結合領域は、第1の不活性化ウイルス結合領域に続いて挿入されており、この第2のウイルス結合

領域は、サブゲノム断片のウイルス転写が低下するように修飾されている。

前述のように、アルファウイルスの転写を開始することができる5'配列、アルファウイルス非構造蛋白をコードするヌクレオチド配列、サブゲノム断片のウイルス転写が防止されるように不活性化されたウイルス結合領域、そしてアルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列よりなる、アルファウイルスcDNAベクター作成体の種々の面が記載された。さらに修飾結合領域と縦列結合領域も記載された。しかしアルファウイルスcDNAベクター作成体は、cDNAからウイルスRNAの合成を開始することができる5'プロモーターの添加により異なる。適切なプロモーターの代表例には、lacプロモーター、メタラチオン(metallathione)プロモーター、CMVプロモーターおよび熱ショックプロモーターなどがある。

前述のように、アルファウイルスcDNAベクター作成体はまた、転写停止を制御する3'配列を含む。このような配列の代表例は、以下の実施例2に詳細に記載される。

## 8. 組織特異的発現

本発明の別の面において、選択された組織内でのみ目的の異種配列を発現することができるアルファウイルスベクター作成体が提供される。このような代表例の1つを図11に示す。簡単に説明すると図11Aに示されるように、標的細胞にベクターが導入される(図11A)と、転写制御配列(例えば、修飾結合領域)に隣接する逆方向反復配列がループ構造から出て(図11Bを参照)、合成結合領域からのサブゲノム配列(「G. O. I.」)のウイルス転写を防ぐように、組換え

アルファウイルスベクターは作成される。

一方、もし逆方向反復配列が、選択された組織または細胞型に特徴的な特異的細胞性RNA配列にもハイブリダイズするように設計さ

れているならば、ベクターの活性化が達成される。このような細胞性RNAは無能化幹ループ構造を破壊し、こうしてさらに安定な2次幹ループ構造を形成させる(図11Cと11D)。この2次幹ループ構造は、結合領域を正しい配置に戻すことによりサブゲノムメッセージの転写を可能にする。

コピー選択と呼ばれる鎖ジャンプ (strand hopping) 機構を用いて負の鎖の合成中に鎖型を交換するウイルスポリメラーゼの能力を利用して、2次幹ループ構造を使用して全長アルファウイルスベクターを転写することもできる (King, RNA genetics II, CRC Press, Inc., Boca Raton Fla., Domingoら (編)、pp. 150-185, 1988)。ポリメラーゼコピー選択の結果として逆方向反復配列は欠失しているため、転写がいったん1回うまく起きれば、得られるRNA転写体は逆方向反復配列を含有しない。この新たに合成されたRNA分子は、前述の任意の他の非無能化ゲノムアルファウイルスベクターのように転写し発現する一次RNAベクター転写体として機能する。このRNAベクター構造では、標的細胞または組織型にのみ存在する特異的RNA配列が、逆方向反復配列の設計に使用されるなら、無能化したシンドビスベクターの組織または細胞特異的な活性化が達成される。この方法でシンドビスのようなアルファウイルスは、前述の類似の逆方向反復配列を用いて、組織特異的発現ベクターとして作成することができる。

組織特異的発現を達成するこのベクター系を用いると、治療的アルファウイルスベクターまたは粒子を患者に全身的に送達することができる。もしベクターが適切なRNA種を発現しない細胞に感染した場合は、ベクターは非構造蛋白を発現できるのみであり、目的の遺伝子は発現しない。最終的にベクターは無害に分解されるであろう。

前記のベクターを使用すると、種々の治療的応用 (例えば、種々の型の癌の治療のためにベクターを標的とすることを含む) のための事実上の組織特異的発現

が可能になる。この理論は、癌胎児性癌性特異的抗原(CEA)やアルファフェトプロテイン癌マーカーのような癌特異的マーカーの特異的発現に依存する。簡単に説明すると、特異的な癌を標的とするのにこのような癌特異的RNAを使用することは、後述の毒性分子、リンホカインまたはプロドラッグの癌特異的発現を可能にする。この方法は、大腸直腸癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌などの種々の癌のすべてがCEAを発現するため、これらの癌に利用される。本発明のこの面においての使用に適したベクターの1つの代表例は、以下の実施例15に詳述されている。

簡単に説明すると、CEAはアルファフェトプロテイン癌マーカーとともに、最初に記載された癌特異的マーカーの1つであった。CEAは、胎児成長の最初の2回の3ヶ月に消化管、脾臓および肝臓などの胎児組織に見いだされる普通の糖蛋白である(Pathologic Basis of Disease、第3版、1984、Robbinsら、編者)。以前はCEAは大腸の腺癌に特異的であると考えられていたが、後に好感度のラジオイムノアッセイが開発されたため、多くの内胚葉由来の癌(特に脾臓癌、胃癌および食道癌)の血漿中に存在することが明らかになった。

本発明の関連する面において、アルファウイルス細胞特異的発現ベクターは、ウイルス感染細胞型の標的治療のために、ウイルス抗原、リボザイム、アンチセンス配列、またはガンマーインターフェロン( $\gamma$ -IFN)またはIL-2のような免疫刺激性因子を発現するように作成される。特に、特異的外来微生物または病原体感染細胞にアルファウイルスベクターをターゲティングするために、アルファ

ウイルスベクターの逆方向反復配列は、任意の病原体特異的RNAにハイブリダイズするように選択される(例えば、HIV、CMV、HBV、HPV、およびHSVのような病原体に感染された標的細胞)。

本発明のさらに別の面において、遺伝子置換療法を用いる組織特異的代謝性疾患の治療のために、特定の臓器がターゲティングされる。例えば、肝臓は体の多くの代謝機能に関与し、多くの代謝性遺伝性疾患に関連しているため、重要な標的組織である。そのような疾患には、多くのグリコーゲン保存疾患、フェニルケトン尿性、ゴーシェ病および家族性高コレステロール血症などがある。現在多く



### E. 異種配列

本明細書中の開示内容から当業者には明らかなように、パッケージングの効率従ってウイルス力価は、ある程度パッケージングされる配列のサイズに依存する。従って生存可能なウイルスのパッケージングおよび産生の効率を上昇させるには、追加の非コード配列をベクター作成体に付け加えてもよい。さらに本発明のいくつかの実施態様において、ウイルスの力価を上昇または低下させることが好ましいことがある。この上昇または低下は異種配列のサイズ、従ってパッケージングの効率を上昇または低下させることにより達成される。

ベクター作成体には、例えばリンホカイン、トキシン、プロドラッグ、免疫応答を刺激する抗原、リボザイム、および免疫応答を補助または阻害する蛋白、そしてアンチセンス配列（または「アンチセンス応用」のためのセンス配列）のような緩和剤をコードする配列などの広範な異種配列が含まれる。前述のように本発明の種々の実施態様において、本明細書中に提供されるアルファウイルスベクター作成体は2つまたはそれ以上の異種配列を含有（そして、ある実施態様においては発現）してもよい。

### 1. リンホカイン

本発明の1つの実施態様において、異種配列はリンホカインをコードする。簡単に説明するとリンホカインは、免疫エフェクター細胞を増殖、活性化または分化させるのに働く。リンホカインの代表

例には、IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, GM-CSF, CSF-1、およびG-CSFがある。

本発明の関連する実施態様において、異種配列は免疫調節性補助因子をコードする。簡単に説明すると、本発明に関連して使用される「免疫調節性補助因子」は、免疫応答に関与して1つまたはそれ以上の細胞により産生される時、または細胞に外から加えられる時、その補助因子がない時に発生したであろう質または強さとは異なる免疫応答を引き起こす。応答の質または強さは、当業者に公知の種々の方法により測定することができ、例えば細胞の増殖を測定するインビトロ測定法（例えば、 $^3\text{H}$ チミジン摂取）、およびインビトロ細胞毒性測定法（例えば、 $^{51}\text{Cr}$ 放出を測定するもの）（Warnerら、AIDS Res. and Human Retrovirus 7 : 645-655, 1991）がある。

免疫調節性補助因子の代表例は、アルファインターフェロン（Finterら、Drug s 42 (5) : 749-765, 1991 ; 米国特許第4,892,743号 ; 米国特許第4,966,843号 ; WO 85/02862 ; Nagataら、Nature 284 : 316-320, 1980 ; Famillettiら、methods in Enz. 78 : 387-394, 1981 ; Twuら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 2046-2050, 1989 ; Faktorら、Oncogene 5 : 867-872, 1990）、ベータインターフェロン

(Seifら、J. Virol. 65 : 664-671, 1991)、ガンマイインターフェロン (Radfordら、American Society of Hapatology : 2008-2015, 1991 ; Watanabeら、PNAS 86 : 9456-9460, 1989 ; Gansbacherら、Cancer Research 50 : 7820-7825, 1990 ; Maioら、Can. Immunol. Immunother. 30 : 34-42, 1989 ; 米国特許第4,762,791号および4,727,138号)、G-CSF (米国特許第4,999,291号および4,810,643号)、Gn-CSF (WO 85/04188)、TNF (Jayaramanら、J. Immunol. 144 : 942-951, 1990)、インターロイキン-2 (IL-2) (Karupiahら、J. Immunology 144 : 290-298, 1990 ; Weberら、J. Exp. Med. 166 : 1716-1733, 1987 ; Gansbacherら、J. Exp. Med. 172 : 1217-1224, 1990 ; 米国特許第4,738,927号)、IL-4 (Tepperら、Cell 57 : 503-512, 1989 ; Golubekら、Science 254 : 713-716, 1991 ; 米国特許第5,017,691号)、IL-6 (Brakenhoffら、J. Immunol. 139 : 4116-4121, 1987 ; WO 90/06370)、IL-12、IL-15、ICAM-1 (Altmanら、Nature 338 : 512-514, 1989)、ICAM-2、LFA-1、LFA-3、MHCクラスI分子、MHCクラスII分子、 $\beta_2$ -ミクログロブリン、チヤペロン(chaperones)、CD3、B7/BB1、MHC結合トランスポーター蛋白またはこれらの類似体がある。

アルファウイルスベクター作成体中に免疫調節性補助因子を含めるか否かの選択は、補助因子の公知の治療効果に基づくか、または実験的に決定される。例えば慢性B型肝炎感染では、患者の免疫不全を補い従って疾患からの回復を助けるのに、アルファインターフェロンが有効であることがわかっている。あるいは安定な免疫調節性補助因子を実験的に決定してもよい。簡単に説明すると、肝疾患の患者からまず血液試料を採取する。自己細胞またはHLAの一致した細胞(例えば、EBVで形質転換した細胞)でインビトロで、抹消血を再刺激し、肝炎抗原の免疫性部分と免疫調節性補助因子の発現を指令するアルファウイルスベクター作成体で形質導入する。HLAの一致した形質導入細胞を標的として、刺激したPBLをCTL測定法のエフェクターとして使用する。HLAの一致した刺激物質と抗原のみをコードするベクターで形質導入した標的細胞を用いて行った同じ測定法で見られるCTL応答よりも大きい応答は、有用な免疫調節性補助因子であることを示す。

本発明の1つの実施態様において、

免疫調節性補助因子のガンマインターフェロンが特に好ましい。

免疫調節性補助因子の別の例は、B7/BB1補助刺激因子である。簡単に説明するとT細胞の完全な機能の活性化には2つのシグナルが必要である。1つのシグナルは抗原特異的T細胞リセプターと、主要組織適合性複合体(MHC)分子に結合したペプチドとの相互作用により与えられ、第2のシグナル(補助刺激と呼ぶ)は抗原提示細胞によりT細胞に送達される。簡単に説明すると、第2のシグナルはT細胞によるインターロイキン-2(IL-2)産生に必要であり、抗原提示細胞上のB7/BB1分子と、Tリンパ球上のCD28およびCTLA-4リセプターとの相互作用が関与しているようである(Linsleyら、J. Exp. Med., 173:721-730, 1991a、およびJ. Exp. med., 174:561-570, 1991)。本発明の1つの実施態様において、CD8<sup>+</sup> T細胞が拡張した充分活性化するために充分なIL-2を産生するように、B7/BB1はCD8<sup>+</sup> T細胞の補助刺激を起こすために癌細胞に導入される。これらのCD8<sup>+</sup> T細胞は、さらなるCTL機能のために補助刺激が必要ではないためB7を発現していない癌細胞を殺すことができる。B7/BB1因子と例えば免疫原性HBVコア蛋白の両方を発現するベクターは、本明細書に記載した方法を使用して作成することができる。これらのベクターで形質導入される細胞は、より有効な抗原提示細胞となるであろう。HBVコア-特異的CTL応答は、補助刺激リガンドB7/BB1を介して、充分に活性化されたCD8<sup>+</sup> T細胞から増強される。

## 2. トキシン

本発明の別の実施態様において、異種配列はトキシンをコードする。簡単に説明すると、トキシンは細胞の増殖を直接阻害するように作用する。トキシンの代表例には、リシン(Lambら、Eur. J. Biochem. 148:265-270, 1985)、アブリン(abrin)(Woodら、Eur.

J. Biochem. 198:723-732, 1991; Evensenら、J. of Biol. Chem. 266:6848-6852, 1991; Collinsら、J. of Biol. Chem. 265:8665-8669, 1990; Chenら、Fed. of Eur. Biochem Soc. 309:115-118, 1992)、ジフテリアトキシン(Tweten

ら、J. Biol. Chem. 260 : 10392-10394, 1985)、コレラトキシシン (Mekalanosら、Nature 306 : 551-557, 1983 ; Sanchez and Holmgren, PNAS 86 : 481-485, 1989) ゲロニン (gelonin) (Stirpeら、J. Biol. Chem. 255 : 6947-6953, 1980)、ボークウィード (Irvin, Pharmac. Ther. 21 : 371-387, 1983)、抗ウイルス蛋白 (Barbieriら、Biochem. J. 203 : 55-59, 1982 ; Irvinら、Arch. Biochem. & Biophys. 200 : 418-425, 1980 ; Irvin, Arch. Biochem. & Biophys. 169 : 522-528, 1975)、トリチン (trititin)、赤痢菌毒素 (Calderwoodら、PNAS 84 : 4364-4368, 1987 ; Jacksonら、microb. Path. 2 : 147-153, 1987)、シュードモナス外毒素A (Carroll and Collier, J. Biol. Chem. 262 : 8707-8711, 1987)、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (HSVTK) (FieFdら、J. Gen. Virol. 49 : 115-124, 1980)、および大腸菌グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼがある。

### 3. プロドラッグ

本発明の他の実施態様において、異種配列は「プロドラッグ」をコードする。簡単に説明すると、本発明において「プロドラッグ」とは、ほとんどまたは全く毒性のない化合物を毒性生成物に活性化する遺伝子生成物を意味する。このような遺伝子生成物の代表例には、HSVTKとVZVTkがあり、これらはいくつかのプリンアラビノシドおよび置換ピリミジン化合物を選択的にモノリン酸化して、これらを細胞毒性または細胞増殖抑制代謝物に交換する。さらに詳しくは、ガンシクロビル、アシクロビルのような薬剤または他の任意の

類似体 (例えば、FIAU, FIAC, DHPG) をHSVTKに接触させると、薬剤は対応する活性ヌクレオチド三リン酸型にリン酸化される。

本発明に関連して使用される他のプロドラッグの代表例には、大腸菌グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (これはチオキサンチンを毒性のあるチオキサンチンモノリン酸に交換する) (Besnardら、Mol. Cell. Biol. 7 : 4139-4141, 1987) ; アルカリ性ホスファターゼ (これは不活性のリン酸化化合物 (例えば、マイトマイシンリン酸やドコソルピシン-ホスフェート) を毒性の脱リン酸化化合物に交換する) ; カビ性 (例えば、フサリウム・オキシスポラム (Fusarium

Oxysporum))または細菌性シトシンデアミナーゼ(これは5-フルオロシトシンを毒性の化合物5-フルオロウラシルに交換する)(Mullen, PNAS 89:33, 1992);カルボキシペプチダーゼG2(これはパラ-N-ビス(2-クロロエチル)アミノベンジルグルタミン酸からグルタミン酸を切断して、毒性の安息香酸マスタードを生み出す);そしてペニシリン-Vアミダーゼ(これはドコソルピシンとメルファランのフェノキシアセトアピド誘導体を毒性化合物に変換する)(一般的には、Vrudhulaら、J. of Med. Chem. 36(7):919-923, 1993;Kernら、Canc. Immun. Immunother. 31(4):202-206, 1990)がある。

#### 4. アンチセンス配列

本発明の別の実施態様において、異種配列はアンチセンス配列である。簡単に説明すると、アンチセンス配列はRNAに結合して、これにより特定の蛋白の細胞性合成を防止するか、または細胞によるRNA配列の使用を防止するように、設計される。このよな配列の代表例には、アンチセンスチミジンキナーゼ、アンチセンスジヒドロ葉酸リダクターゼ(Maher and Dolnick, Arch. Biochem. & Biophys. 253:214-220, 1987;Bzikら、PNAS 84:8360-8364, 1987)

、アンチセンスHER2(Coussensら、Science 230:1132-1139, 1985)、アンチセンスABL(Fainsteinら、Oncogene 4:1477-1481, 1989)、アンチセンスMyc(Stanleyら、Nature 310:423-425, 1984)およびアンチセンスras、そしてヌクレオチド生合成経路の任意の酵素を阻止するアンチセンス配列がある。さらに本発明の別の実施態様において、 $\gamma$ -インターフェロンおよび $\beta$ -2ミクログロブリンに対するアンチセンス配列は、免疫応答を低下させるために使用される。

さらに本発明の別の実施態様において、アンチセンスRNAは強力なクラスI制限応答を誘導するために使用される。簡単に説明すると、RNAに結合してこれにより特異的mRNAの翻訳を防止する以外に、高レベルの特異的アンチセンス配列は多量の2本鎖RNAの形成のためインターフェロン(ガンマーインターフェロンを含む)の発現の増加を誘導すると考えられる。次にガンマーインターフェロンの発現は増加は、MHCクラスI抗原の発現を増強する。この転写で使用に好適なアンチセンス配列には、アクチンRNA、ミオシンRNA、およびヒストンRNAがある。

アクチンRNAと不適正塩基対と形成するアンチセンスRNAは特に好ましい。

## 5. リボザイム

本発明の1つの面において、宿主細胞に感染するとリボザイムを産生するアルファウイルスベクターが提供される。簡単に説明すると、特異的RNAを切断するのにリボザイムが使用され、1つの特異的RNAのみに影響を与えるようにリボザイムは設計される。一般的には、リボザイムの基質結合配列は10~20ヌクレオチドの長さである。この配列の長さは、標的RNAとハイブリダイズし、切断されたRNAからリボザイムを解離するのに充分である。リボザイムを作成する代表例には、米国特許第5,116,742号；5,225,337号；そして、米国特許第5,246,921号に記載のものがある。本発明における使用に特に好適なりボザイムには、以下の実施例（例えば実施例18）に詳述されるものがある。

## 6. 蛋白と他の細胞成分

本発明の別の面において、広範な蛋白または他の細胞成分がアルファウイルスベクター作成体に担持される。そのような蛋白の代表例には、例えばウイルス、細菌、寄生体、またはカビ中に見いだされる未変性または変化した細胞成分、および外来蛋白または細胞成分がある。

### (a) 変化した細胞成分

1つの実施態様において、免疫原性で非癌原性の、変化した細胞成分の発現を指令するアルファウイルスベクター作成体が提供される。本明細書において、「免疫原性」とは適切な条件下で免疫応答を引き起こすことができる細胞成分を意味する。この応答は細胞性であるが、体液性応答を含んでいてもよい。用語「非癌原性」とは、細胞の形質転換またはヌードマウスの癌形成を誘導しない、変化した細胞成分を意味する。用語「変化した細胞成分」とは細胞を癌原性にするに関連するか、または癌原性細胞一般に関連するが細胞を癌原性にするために必須ではない蛋白および他の細胞成分を意味する。

変化の前に、正常な細胞の増殖および制御に細胞成分が必須であり、これには例えば、細胞内蛋白分解、転写制御、細胞サイクルの制御、および細胞-細胞相互作用が含まれる。変化後には細胞成分はもう制御機能を果たさず、従って細胞

は制御できない増殖を示す。変化した細胞成分の代表例には、ras'、p53'、Rb'、ウィルムズ癌遺伝子(Wilms' tumor gene)によりコードされる変化した蛋白、ユビキチン'、ムチン'、DCC、APCおよびMCC遺伝子にコード

される蛋白、乳癌遺伝子BRCA1'、およびリセプターまたはリセプター様構造（例えば、neu、甲状腺ホルモンリセプター、血小板由来増殖因子（PDGF）リセプター、インスリンリセプター、上皮増殖因子（EGF）リセプター、およびコロニー刺激因子(CSF)リセプターがある。

本発明の1つの実施態様において、非癌原性で変化したras（ras'）遺伝子の発現を指令するアルファウイルスベクター作成体が提供される。簡単に説明すると、ras' 遺伝子は新生物性表現型に軽く結合しているため魅力的な標的であり、確かに広範な確定癌（例えば膵臓癌、大腸癌および肺腺癌）の癌原性の誘導と維持に必要なかも知れない。さらにras' 遺伝子は前新生物癌において見いだされ、従って悪性癌の検出の前に免疫介在療法が行われる。

正常なras遺伝子は非癌原性であり、すべての動物に存在する。これは進化の過程で高度に保存されており、細胞サイクルと正常な増殖性の維持に重要な役割を果たすようである。正常なras遺伝子は、GTPに結合しGTPase活性を示すG-蛋白であり、外部環境から細胞内部へシグナルを伝達するのに関与しており、こうして細胞が環境に応答することを可能にする。一方ras' 遺伝子は、細胞の挙動を環境から切り離してしまい、新生物細胞の制御されない増殖を導くことにより、新生物細胞の正常な増殖制御を変化させる。ras遺伝子の突然変異は発癌性の初期の出来事であり(Kumarら、Science 248:1101-1104, 1990)、これは早期に治療されれば癌発生を防止することができる。

ras' 遺伝子は広範な癌（例えば、膵臓癌、大腸癌および肺腺癌）に存在する。

種々の癌で見られるras' 遺伝子に発生する突然変異の範囲は極めて限定されている。これらの突然変異は、正常なオン／オフスイ

ッチを構成性のオンの位置に変換することにより、ras蛋白のGTPase活性を変化させる。ras' の癌原性突然変異は、主に3つのコドンにのみ起きる：12、13そし



て61。ヒトおよび動物の癌において、コドン12の突然変異が最も多い。

以下の表1はヒトのrasを活性化するインビボの突然変異（コドン12, 13および61）、およびインビトロの形質転換活性を有する可能性のある突然変異を要約する。インビトロの形質転換活性を有する可能性のある突然変異は、正常のコドンのアミノ酸の全体的な置換（例えば、12位の正常なグリシンの代わりに他のアミノ酸が置換されている）により産生される。インビトロの突然変異はヒトや動物で発生することは知られていないが、最終的にインビボで発生することが見いだされれば、抗癌性免疫療法の基礎となるかも知れない。

表1

ヒトのras 蛋白を活性化するアミノ酸置換

アミノ酸 突然変異コドン	Gly 12	Gly 13	Ala 59	Gln 61	Glu 63	Asn 116	Lys 117	Asp 119
インビボ		Val Arg Asp Cys Ala Ser	Asp Val Arg		Arg His Leu			
インビトロ		Phe Ala Asn Gln Glu His Ile Leu Lys Met Phe Ser Thr Trp Tyr	Ser	Thr	Val Ala Cys Asn Ile Met Thr Tyr Trp Phe Gly	Lys	His Ile Arg	Glu Glu Ala Asn

上記の変化により、新規なコード配列を含有する蛋白が産生される。これらの配列にコードされる新規蛋白は癌原性細胞のマーカーとして使用され、これらの新規コード領域に対する免疫応答は、変化した配列(ras')を含有する癌原性細胞を破壊するのに使用される。

本発明の別の実施態様において、変化した53(p53')遺伝子の発現を指令するアルファウイルスベクター作成体が提供される。簡単に説明すると、p53は元々形質転換した細胞の抽出物中に発見された核リン蛋白であり、従って最初は癌遺伝

子として分類された (Linzer and Levine, Cell 17 : 43-52, 1979 ; Lane and Crawford, Nature 278 : 261-263, 1979) 。後に、元々のp53 cDNAクローンはp53の突然変異体であることが発見された (Hindsら、J. Virol. 63 : 739-746, 1989) 。p53は細胞サイクルを負に制御する癌抑制遺伝子であり、この遺伝子の突然変異が癌形成につながるようである。研究された大腸癌のうち75%~80%はp53の両方の対立遺伝子がなくなっている (一方は欠失により、他方は点突然変異による) 。肺癌や脳および乳癌でも同様の突然変異が見られる。

p53突然変異の多く (例えば、p53<sup>'1</sup>、p53<sup>'2</sup>など) は、アミノ酸残基130~290の間に集まっている (Levineら、Nature 351 : 453-456, 1991を参照 ; および具体的な突然変異をさらに詳細に説明する以下の文献も参照 : Bakerら、Science 244 : 217-221, 1989 ; Nigroら、Nature 342 : 705-708, 1989 (p53突然変異は遺伝子の高度に保存された4つの領域に一致する「ホットスポット」に集まり、これらの突然変異はヒトの脳癌、乳癌、肺癌および大腸癌で観察される) ; Vogelstein, Nature 348 : 681-682, 1990 ; Takahashiら、Science 246 : 491-494, 1989 ; Iggoら、Lancet 335 : 675-679, 1990 ; Jamesら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 2858

-2862, 1989 ; Mackayら、Lancet 11 : 1384-1385, 1988 ; Kelsonら、Blood 74 : 2318-2324, 1989 ; Malkinら、Science 250 : 1233-1238, 1990 ; Bakerら、Cancer Res. 50 : 7717-7722, 1991 ; Chibaら、Oncogene 5 : 1603-1610, 1990 (初期の非小細胞肺癌の病因は、コドン132~283の間のp53遺伝子の体細胞性突然変異が関係している) ; Prosserら、Oncogene 5 : 1573-1579, 1990 (アミノ酸126~224をコードするp53遺伝子の突然変異が原発性乳癌で同定された) ; Cheng and Hass, Mol. Cell. Biol. 10 : 5502-5509, 1990 ; Bartekら、Oncogene 5 : 893-899, 1990 ; Rodriguesら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 : 7555-7559, 1990 ; Menonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 : 5435-5439, 1990 ; Mulliganら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 : 5863-5867, 1990 ; およびRomanoら、Oncogene 4 : 1483-1488, 1990 (ヒトの骨肉腫由来細胞株HOS-SLのコドン156のp53突然変異の同定) ) 。

p53遺伝子のいくつかの変化は、いくつかの特異的トキシンが原因である。例えば、Bressacら (Nature 350: 429-431, 1991) は、肝細胞癌患者のコドン249の特異的なGからTへの突然変異を記載している。この突然変異の示唆されている原因物質は、アフリカで食物汚染物質として知られている肝臓癌の癌原性物質であるアフラトキシンB<sub>1</sub>である。

特に影響を受ける遺伝子の4つの領域は、残基132~145, 171~179, 239~248、そして272~286である。特に興味深いこれらの領域に見いだされる3つの「ホットスポット」は、残基175, 248そして273 (Levinら、Nature 351: 453-456, 1991) に存在する。これらの変化および前述の他の変化により、新規のコード配列を含有する蛋白が産生される。これらの配列にコードされる新規蛋白は癌原性細胞のマーカーとして使用でき、これらの新規コード配列に対

する免疫応答は、変化した配列を含有する癌原性細胞(p53<sup>+</sup>)を破壊するのに使用される。

変化した細胞成分をコードする配列がいったん得られたら、これらの配列が非癌原性蛋白をコードすることを確認することが必要である。種々の測定法が公知であり、特定の細胞成分の癌原性を評価する測定法が容易に実施できる。代表的測定法には、ラット繊維芽細胞測定法、ヌードマウスまたはラットにおける癌形成、軟寒天中のコロニー形成、およびトランスジェニック動物 (例えばトランスジェニックマウス) の調製などがある。

ヌードマウスまたはラットにおける癌形成は、特定の細胞成分の癌原性を測定するのに特に重要で高感度な測定法である。ヌードマウスは機能的な細胞免疫系が欠如しており (すなわち、CTLを有さない)、従って細胞の癌原性の可能性を調べるのに有用なインビボのモデルである。正常な非癌原性細胞は、ヌードマウスに感染させても制御できない増殖は示さない。しかし形質転換した細胞はヌードマウス中で急速に増殖し、癌を発生させる。簡単に説明すると1つの実施態様において、アルファウイルスベクター作成体は同系のマウスの細胞に投与され、次にヌードマウスに注射される。癌の増殖を調べるために注射後2~8週間マウスを肉眼で観察する。また癌の存在を調べるために、マウスを屠殺して解剖して

もよい (Giovanelloら、J. Natl. Cancer Inst. 48:1531-1533, 1972; Fursezら、Abnormal Cells, New Products and Risk, Hopps and Petricciani編、Tissue Culture Association, 1985; および Levenbookら、J. Biol. Std. 13:135-141, 1985)。

癌原性はまた軟寒天中のコロニー形成を目視することによっても評価することができる (Macpherson and Montagnier, Vir. 23:291-294, 1964)。簡単に説明すると、正常な非癌原性細胞の1つの性

質は「接触阻害」である (すなわち、細胞は隣接する細胞に接触すると増殖を止める)。細胞を半固体寒天支持培地中に入れると、正常な細胞はすぐ接触阻害を受けて増殖を止めるが、癌原性細胞は増殖し続け軟寒天中でコロニーを形成する。

変化した細胞成分の癌原性を評価するのに。トランスジェニック動物 (例えばトランスジェニックマウス) も使用することもできる。(Stewartら、Cell 38:627-637, 1984; Quaifeら、Cell 48:1023-1034, 1987; および Koikeら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5615-5619, 1989)。トランスジェニック動物では目的の遺伝子は、動物のすべての組織中で発現される。この突然変異遺伝子の無制御な発現は、新たに導入された遺伝子の癌原性の可能性を調べるためのモデルとして役に立つ。

変化した細胞成分が細胞を癌原性に関係しているならば、変化した細胞成分を非癌原性にする必要がある。例えば1つの実施態様において、変化した細胞成分をコードする目的の配列または遺伝子は、遺伝子生成物を非癌原性にするために端が切り取られる。変化した細胞成分をコードする遺伝子は種々のサイズに切り取られるが、変化した細胞成分をできるだけ保持することが好ましい。さらに切り取りが行われても、変化した細胞成分の免疫原性配列の少なくともいくつかは無傷であることが必要である。あるいは複数の翻訳停止コドン免疫原性領域の下流に導入してもよい。停止コドンの挿入により蛋白発現が早期に停止され、こうして蛋白の形質転換部分の発現を防止する。

1つの実施態様において、ras' 遺伝子はras' 蛋白を非癌原性にするために端が

切り取られる。簡単に説明するとras'のカルボキシル末端アミノ酸は、機能的に蛋白を細胞膜に結合させる。これらの配列の端の切り取りは、変化した細胞成分を非癌原性にする。

好ましくはras'遺伝子はプリン環結合部位（例えば、アミノ酸番号110をコードする配列の近辺）で端が切り取られる。アルファウイルスベクター作成体によりわずかに約20アミノ酸（変化したアミノ酸を含む）がコードされるようにするたにras'遺伝子の端を切り取ることができるが、できるだけ多くのアミノ酸が発現される（非癌原性を維持しながら）ことが好ましい。

別の実施態様において、細胞成分を非癌原性にするためにp53'蛋白は端の切り取りにより修飾される。前述のように必ずしもすべてのp53蛋白の突然変異が癌原性ではなく、従って必ずしもすべての突然変異の端を切り取る必要はない。しかしながら好適な実施態様では、p53'はアミノ酸100~300をコードする配列まで端を切り取り、こしてすべての4つの主要な「ホットスポット」は含まれている。

発癌性である他の変化した細胞成分も非癌原性にするために、その端を切り取ることもできる。例えばneuおよびbcr/ablもこれらを非癌原性にするために端を切り取ることができる。非癌原性は、端が切り取られた変化した細胞成分を前述のように測定法することにより確認することができる。

しかし変化した細胞成分は非癌原性細胞一般にのみ関連していて、細胞を癌原性にするのに必要または必須でない場合は細胞成分を非癌原性にする必要はない。癌原性でないそのような変化した細胞成分の代表例には、Rb'、ユビキチン(ubiquitin)'そしてムチン'がある。

前述のように適当な免疫応答を作り出すために、変化した細胞成分は免疫原性でなければならない。特定の配列の免疫原性は予測することが難しいが、T細胞のエピトープはしばしば免疫原性で両親媒性のアルファラセン成分を有する。しかし一般に免疫原性は測定

により決めることが好ましい。代表的測定法には、新規に導入したベクターに対

する抗体の存在を検出するELISA、およびガンマインターフェロン測定法、IL-2産生測定法、および増殖測定法のようにTヘルパー細胞を試験する測定法がある。

前述のように一般的な抗癌治療薬を作成するために、いくつかの異なる変化した細胞成分を同時発現することができる。一般に種々の組合せが可能であることは当業者には明らかであろう。好適な実施態様では、この治療薬は特定の型の癌を標的とする。例えばほとんどすべての大腸癌は、ras, p53, DCC, APCまたはMC C遺伝子に突然変異を有する。これらのいくつかの変化した細胞成分を同時発現するアルファウイルスベクター作成体が、すべての可能な突然変異を治療するために大腸癌患者に投与される。この方法は他の癌の治療にも使用できる。すなわち、ムチン<sup>\*</sup>, ras<sup>\*</sup>, neu, BRCA1<sup>\*</sup>, およびp53<sup>\*</sup>を同時発現するアルファウイルスベクター作成体は、乳癌の治療に使用できる。

#### (b) 外来生物または他の病原体の抗原

本発明の他の面において、外来生物または他の病原体からの抗原の免疫原性部分の発現を指令するアルファウイルスベクター作成体が提供される。外来抗原の代表例には、細菌性抗原（例えば、大腸菌、ストレプトコッカス、スタフィロコッカス、マイコバクテリウムなど）、カビ抗原、寄生体抗原、およびウイルス抗原（例えば、インフルエンザウイルス、ヒト免疫不全症ウイルス（「HIV」）、A型、B型、およびC型肝炎ウイルス（それぞれ、「HAB」、「HBV」、および「HCV」）、ヒトパピローマウイルス（「HPV」）、エプスタインバーウイルス（「EBV」）、単純ヘルペスウイルス（「HSV」）、ハンタウイルス、TTLV I, HTLV I Iおよびサイトメガロウイルス（「CMV」）がある。本明細書中で使用される「免疫原性

部分」とは、適当な条件下で免疫応答（すなわち、細胞性または体液性）を引き起こすことができる各抗原の部分を意味する。「部分」とは種々のサイズであるが、好ましくは少なくとも9アミノ酸の長さであり、完全な抗原を含有してもよい。細胞性免疫応答は主要組織適合性抗原複合体（「MHC」）クラスI, MHCクラスII、またはその両方を介する。

本発明の1つの面において、B型肝炎抗原の免疫原性部分の発現を指令するアルファウイルスベクター作成体が提供される。簡単に説明するとB型肝炎のゲノムは、約3.2キロダルトンの長さの環状DNAよりなる (Tiollaisら、Science 213 : 406-411, 1981 ; Tiollaisら、Nature 317 : 489-495, 1985 ; および Ganem and Varmus, Ann. Rev. Biochem. 56 : 651-693, 1987 ; EP 0 278,940, EP 0 241,021 , WO 88/10301、および米国特許第4,696,898号と5,024,938号も参照、これらは参考のため本明細書に引用される)。B型肝炎ウイルスは数個の異なる抗原を示し、特に3つのHB「S」抗原 (HBsAGs)、HBc抗原 (HBcAg)、HBe抗原 (HBeAg)、およびHBx抗原 (HBxAg)がある (Blumら、TIG 5 (5) : 154-158, 1989を参照)。簡単に説明すると、HBeAgはP22プレコア中間体の蛋白分解切断により得られ、細胞から分泌される。HBeAgは血清中に17kD蛋白として存在する。HBcAgは183アミノ酸の蛋白であり、HBxAgはサブタイプにより異なり、145~154アミノ酸の蛋白である。

HBsAGs (「大」、「中」、「小」と呼ぶ)はB型肝炎ウイルスゲノムの3つの領域によりコードされる: S、プレ-S2およびプレ-S1。389~400アミノ酸の長さを有する大蛋白はプレ-S1、プレ-S2およびS領域によりコードされ、グリコシル化または非グリコシル化型で見いだされる。中蛋白は281アミノ酸の長さで、プレ-S2とS領域によりコードされる。小蛋白は226アミノ酸の長さであり、

S領域によりコードされる。これは2つの型で存在する: グリコシル化 (GP27) と非グリコシル化 (P24)。これらの領域が別々に発現されると、プレ-S1領域は約119アミノ酸の蛋白をコードし、プレ-S2領域は約55アミノ酸の蛋白をコードし、そしてS領域は約226アミノ酸の蛋白をコードする。

当業者には明らかなように、前述のアルファウイルスベクター作成体の1つにより投与された時免疫応答を誘導するように、上記のS抗原の種々の免疫原性部分を組合せることができる。さらにHBVのSオープンリーディングフレーム (open reading frame) の異なる領域に見いだされる大きな免疫学的多様性のために、特定の地域では投与のために抗原の特定の組合せが好まれる。簡単に説明すると、ヒトB型肝炎ウイルスS試料中に見いだされるエピトープは、抗原決定基「

α」と定義される。しかし互いに排他的なサブタイプ抗原決定基は、二次元2重免疫拡散法(Ouchterlony, *Progr. Allergy* 5 : 1, 1958)により同定されている。これらの抗原決定基は「d」または「y」、および「w」または「r」と命名されている(LeBouvier, *J. Infect.* 123 : 671, 1971; Bancroftら, *J. Immunol.* 109 : 842, 1972; およびCourouceら, *Bibl. Haematol.* 42 : 1-158, 1976)。この免疫学的多様性はB型肝炎ウイルスSオープンリーディングフレームの2つの領域の単一のヌクレオチド置換に起因し、これが以下のアミノ酸変化を引き起こす：(1) B型肝炎ウイルスSオープンリーディングフレーム中のリジン-22からアルギニン-160への変化は、サブタイプをdからyに変化させ、そして(2) アルギニン-160からリジンへの変化は、サブタイプをrからwに変化させる。アフリカ人の間ではサブタイプaywが多く、米国や北ヨーロッパではサブタイプadw<sub>2</sub>が多い(*Molecular Biology of the Hepatitis B Virus*, McLachlan編, CRC Press, 1991)。

当業者には明らかなように、投与される地域に多い特定のB型肝炎ウイルスサブタイプに適切な、投与用のベクターを作成することが一般に好ましい。特定の地域のサブタイプは、二次元2重免疫拡散法、好ましくはその地域の個人から単離されたB型肝炎ウイルスのSオープンリーディングフレームを配列決定することにより決定される。

HBVにまたは、pol(「HBV pol」), ORF5、そしてORF6抗原がある。簡単に説明すると、HBVのポリメラーゼオープンリーディングフレームは、感染した肝臓のウイルス粒子やコア様粒子に見いだされる逆転写酵素活性をコードする。ポリメラーゼ蛋白は少なくとも2つのドメインよりなる：逆転写を開始する蛋白をコードするアミノ酸ドメインと、逆転写酵素とRNase H活性をコードするカルボキシル末端ドメイン。HBV polの免疫原性部分は、本明細書に記載の方法(例えば、以下および実施例12A2および13)と、下記のアルファウイルスベクター作成体を用いて決定され、温血動物で免疫応答を生成させるために投与される。同様にORF5とORF6のような他のHBV抗原(Millerら, *Hepatology* 9 : 322-327, 1989)が、本明細書に記載のアルファウイルスベクター作成体を用いて発現される。ORF5



とORF6を用いるアルファウイルスベクター作成体の代表例は、以下の実施例に記載されている。

前述のようにB型肝炎抗原の少なくとも1つの免疫原性部分が、アルファウイルスベクター作成体中に取り込まれる。アルファウイルスベクター作成体に取り込まれる免疫原性部分は種々の長さであるが、一般的には少なくとも9アミノ酸の長さであることが好ましいが全抗原を含有してもよい。特定の配列の免疫原性を予測することは困難であるが、T細胞のエピトープは可能性のあるTヘルパー部位とCTL部位のコード配列をスキャンするためにTSITES (MedImmune

Inc.、メリーランド)のようなコンピューター手法を用いて予測できる。この解析から、ペプチドが合成され、インビトロの細胞毒性測定法で標的として使用される。新規に導入したベクターに対する抗体の存在を検出するELISA、およびガンインターフェロン測定法、IL-2産生測定法、および増殖測定法のようなTヘルパー細胞を試験する測定法がある。

免疫原性部分はまた他の方法により選択される。例えば、HLA A2.1トランスジェニックマウスは、ウイルス抗原のヒトT細胞認識のモデルとして有用であることが証明されている。簡単に説明するとインフルエンザウイルスとB型肝炎ウイルス系では、マウスのT細胞リセプター群がヒトのT細胞により認識される抗原決定基と同じものを認識する。両方の系においてHLA A2.1トランスジェニックマウスで産生されるCTL応答は、ヒトのHLA A2.1ハプロタイプのCTLにより認識されるエピトープと事実上同じエピトープに対する(Vitielloら、J. Exp. Med. 173: 1007-1015, 1991; Vitielloら、Abstract of Molecular Biology of Hepatitis B Virus Symposia, 1992)。

アルファウイルスベクター作成体への導入に特に好適な免疫原性部分は、HBeAg、HBcAg、およびHBsAg(以下の実施例10に詳述される)を含む。

B型肝炎ウイルスの追加の免疫原性部分は、コード配列を種々の位置(例えば、BstI、SspI、PpuMI、およびMspI)で端を切り取ることにより得られる(Valenzuelaら、Nature 280: 815-19, 1979; Valenzuelaら、Animal Virus Genetics: ICN/UCLA Symp. Mol. Cell Biol., 1980, B. N. Fields and R. Jaenisch

編、pp. 57-70, New York : Academic)。適当な免疫原性部分を決定するさらなる方法は、以下のC型肝炎の項で記載される。

前述のように、アルファウイルスベクター作成体には2つ以上の免疫原性部分が導入される。例えばアルファウイルスベクター作成体は、HBcAg, HBeAg, HBsAg, HBxAgのすべてまたは免疫原性部分、およびHCV抗原の免疫原性部分を（別に、または1つの作成体として）発現する。

#### 7. 異種配列の供給源

前述の蛋白をコードする配列は、種々の供給源、例えばアメリカンタイプカルチャーコレクション (American Type Culture Collection) (ATCC、ロックヴィル、メリーランド州)、またはブリティッシュ・バイオテクノロジー社 (British Bio-Technology Limited) (コーレイ、オックスフォード、イングランド) から容易に得られる。代表例には、BBG12 (127アミノ酸の成熟蛋白をコードするGM-CSF遺伝子を含む) ; BB6 (ガンマインターフェロンをコードする配列を含む) ; ATCC No. 39656 (TNFをコードする配列を含む) ; ATCC No. 20663 (アルファインターフェロンをコードする配列を含む) ; ATCC No. 31902 および 39517 (ベータインターフェロンをコードする配列を含む) ; ATCC No. 67024 (インターロイキン-1bをコードする配列を含む) ; ATCC No. 39405, 39452, 39516, 39626 および 39673 (インターロイキン-2をコードする配列を含む) ; ATCC No. 59399, 59398, および 67326 (インターロイキン-3をコードする配列を含む) ; ATCC No. 57592 (インターロイキン-4をコードする配列を含む) ; ATCC No. 59394 および 59395 (インターロイキン-5をコードする配列を含む) ; そして ATCC No. 67153 (インターロイキン-6をコードする配列を含む) がある。

前述の変化した細胞生成物をコードする配列は、種々の供給源から容易に得られる。例えば、変化した細胞生成物をコードする配列

を含むプラスミドは、アメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC、ロックヴィル、メリーランド州) のような寄託機関、またはアドバンスト・バイオ

テクノロジーズ (Advanced Biotechnologies (コロンビア、メリーランド州) のような市販の供給源から得ることもできる。前述の配列のいくつかを含有するプラスミドの代表例には、ATCC No. 41000 (rasの12番目のコドンにGからTへの突然変異を含む)、およびATCC No. 41049 (12番目のコドンにGからAへの突然変異を含む) がある。

あるいは正常な細胞成分をコードするプラスミドは、ATCCのような寄託機関から得られ (例えば、ATCC No. 41001、正常なras蛋白をコードする配列を含む; ATCC No. 57103, ablをコードする; ATCC No. 59120または59121, bcr座をコードする)、変化した細胞成分を形成するために突然変異される。特定の部位を突然変異する方法は、公知の方法 (例えば、Sambrookら、前述、15.3以下参照) を用いて容易に実施される。特にrasのような正常な細胞成分の点突然変異は、特定のコードン (例えば、コードン12, 13、または61) の部位特異的突然変異により容易に実施できる。

前述のウイルス抗原をコードする配列も同様に種々の供給源から得られる。例えば、B型肝炎ウイルスをコードする分子的にクローン化したゲノムは、アメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC、ロックヴィル、メリーランド州) のような供給源から得られる。例えばATCC No. 45020は、pBR322 (Moriartyら、Proc. Natl. Acad. Sci., USA 87: 2606-2610, (1981) のBamHI 部位にB型肝炎の全ゲノムDNA (精製したDane粒子から抽出された) (Blumら、TIG 5 (5): 154-158, 1989の図3を参照) を含有する。

あるいは前述の異種配列をコードするcDNA配列は、配列を発現または含有する細胞から得られる。簡単に説明すると1つの実施態様

において、目的の遺伝子を発現する細胞のmRNAは、オリゴヌクレオチドdTまたはランダムプライマーを用いて逆転写酵素により逆転写される。次にこの1本鎖cDNAを、目的の配列のいずれかの側の配列に相補的なオリゴヌクレオチドプライマーを用いてPCRにより増殖する (米国特許第4,683,202号; 4,683,195号および4,800,159号を参照。PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, Erlich編、Stockton Press, 1989も参照)。特に2本鎖DNAは、熱安

定性Taqポリメラーゼ、配列特異的DNAプライマー、dATP、dCTP、dGTPおよびdTTPの存在下で、加熱により変性される。合成が完了すると2本鎖DNAが産生される。このサイクルは何回も繰り返すことができ、目的のDNAが何乗増も増殖される。

前述の蛋白をコードする配列はまた、例えばApplied Biosystems Inc. のDNA合成機（例えば、APB DNA合成機モデル392（フォスターシティ、カリフォルニア州））で合成することもできる。

#### 7. 真核細胞重層ベクターイニシエーション系

前述のように本発明はまた、5'プロモーター、自立的にまたは1つまたはそれ以上の因子に応答して細胞内で複製することができる異種ヌクレオチド配列を発現することができる作成体（例えばアルファウイルスベクター作成体）、そして転写停止配列よりなる、真核細胞重層ベクターイニシエーション系を提供する。簡単に説明すると、真核細胞重層ベクターイニシエーション系は、異種ヌクレオチド配列の発現を制御する2段階または「重層」機構を提供する。第1の層は第2の層の転写を開始し、5'プロモーター、転写停止部位、および1つまたはそれ以上のスプライス部位と、必要であればポリアデニル化部位よりなる。この点で使用に適したプロモーターの代表例には、任意の細胞性プロモーター（例えば、CMV、レトロウイルスLTR、SV40、 $\beta$ -アクチン、免疫グロブリンプロモ-

ーター）、および誘導性プロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーターやグルココルチコイドプロモーター）がある。第2の層は1つまたはそれ以上の異種ヌクレオチド配列を発現することができ、自律的にまたは1つまたはそれ以上の因子に応答して細胞中で複製することができる作成体よりなる。1つの実施態様において、作成体は前述のシンドビスcDNAベクター作成体でもよい。

真核細胞重層ベクターイニシエーション系では、以下のウイルスから開発されるウイルス性ベクター作成体を含む、広範な他のcDNAおよびDNAベクター作成体を使用できる：ポリオウイルス（Evansら、Nature 339: 385-388, 1989；およびSabin, J. Biol. Standardization 1: 115-118, 1973）；ライノウイルス；カナリア痘ウイルスまたはワクシニアウイルスのようなポックスウイルス（Fisher-H

ochら、PNAS 86 : 317-321, 1989 ; Flexnerら、Ann. N. Y. Acad. Sci. 569 : 86-103, 1989 ; Flexnerら、Vaccine 8 : 17-21, 1990 ; 米国特許第4,603,112号、4,769,330号および5,017,487号 ; WO 89/01973) ; SV40 (Mulliganら、Nature 277 : 108-114, 1979) ; レトロウイルス (米国特許第4,777,127号、GB 2,200,651, EP 0,345,242およびWO 91/02805) ; インフルエンザウイルス (Luytjesら、Cell 59 : 1107-1113, 1989 ; McMichaelら、N. Eng. J. Med. 309 : 13-17, 1983 ; およびYapら、Nature 273 : 238-239, 1978) ; アデノウイルス (Berkner, Biotechniques 6 : 616-627, 1988 ; Rosenfeldら、Science 252 : 431-434, 1991) ; アデノ関連ウイルスのようなパーボウイルス (parvovirus) (Samulskiら、J. Vir. 63 : 3822-3828, 1989 ; Mendelsonら、Virol. 166 : 154-165, 1988 ; PA 7/222,684) ; ヘルペス (Kit, Adv. Exp. Med. Biol. 215 : 219-236, 1989) ; SV40 ; HIV (Poznansky, J. Virol. 65 : 532-536, 1991) ; 麻疹 (EP 0,440,219) ; アストロウイルス (Munroeら、J. Vir. 67 : 3611-3614, 1993) ; セムリキ森林ウイルスおよびコロナウイルス、および他のウイルス系 (例えば、EP 0,440,219 ; WO 92/06693 ; 米国特許第5,166,057号)。

前述のように本発明の1つの実施態様において、真正の5'末端でアルファウイルスのインビトロ転写を開始することができる5'配列、アルファウイルスの転写を開始することができる5'配列、アルファウイルス非構造蛋白をコードするヌクレオチド配列、ウイルス結合領域、異種ヌクレオチド配列、アルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列、およびポリアデニル酸配列よりなる、真核細胞重層ベクターイニシエーション系が提供される。アルファウイルスcDNAベクター作成体のインビトロ転写に引き続いて、得られるアルファウイルスRNAベクター分子は、アルファウイルスの転写を開始することができる5'配列、アルファウイルス非構造蛋白をコードするヌクレオチド配列、ウイルス結合領域、異種ヌクレオチド配列、アルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列およびポリアデニル酸配列よりなる。

本発明の別の面において、温血動物に真核細胞重層ベクターイニシエーション

系を投与する工程よりなる、温血動物に異種ヌクレオチド配列を送達する方法が提供される。真核細胞重層ベクターイニシエーション系は温血動物に、直接（例えば、静脈内、筋肉内、腹腔内、皮下、経口、直腸内、眼内、鼻腔内）に、またはリポフェクション(lipofection)のような種々の物理的方法(Felgnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417, 1989)、直接DNA注射(Acsadiら、Nature 352:815-818, 1991)；微小発射体衝撃(microprojectile bombardment) (Williamsら、PNAS 88:2726-2730, 1991)；数種の型のリポソーム（例えば、Wangら、PNAS 84:7851-7855, 1987を参照）；CaPO<sub>4</sub> (Dubenskyら、PNAS 81:7529-753

3, 1984)；DNAリガンド(Wuら、J. of Biol. Chem. 264:16895-16897, 1989)；核酸単独の投与(WO 90/11092)；または死滅したアデノウイルスに結合したDNAの投与(Curielら、Hum. Gene Ther. 3:147-154, 1992)；ポリリジン、リセプター特異的リガンドとしてのポリ陽イオン化合物；およびソラレン不活性化ウイルス（例えばセンダイウイルスまたはアデノウイルス）により投与される。

真核細胞重層ベクターイニシエーション系は、特異的免疫応答を刺激するために；薬剤と宿主細胞リセプターとの相互作用を阻害するために；毒性緩和剤（例えば、条件性毒性緩和剤）を発現するために；免疫系を制御するために；マーカーを発現するために、そして置換遺伝子療法のために、温血動物に投与することもできる。これらおよび他の用途はさらに詳細に以下に記載される。

#### G. シンドビスパッケージング細胞株

本発明のさらなる実施態様において、アルファウイルスパッケージング細胞株が提供される。特に本発明の1つの面において、安定に組み込まれた発現ベクターからウイルス構造蛋白がトランスに供給される、アルファウイルスパッケージング細胞株が提供される。アルファウイルスベクターRNA転写体の以後のトランスフェクションまたは感染は、アルファウイルスベクター産生細胞株を作り出す。例えば、本発明の1つの実施態様において、目的の遺伝子をコードするcDNAクローンとアルファウイルス非構造蛋白から転写するために、T6インビトロRNAポリメラーゼ系を用いて、まずアルファウイルスRNAベクター分子が産生される。

このベクターRNAは次に、アルファウイルスパッケージング細胞株にトランスフェクションされ、ここでRNA転写体は高レベルに複製し、次にウイルス構造蛋白によりパッケージングされて、感染性ウイルス粒子を与える。アルファウイルスcDNA分子は長いため、インビトロの転写反応は非効率

的である。さらにシャーレ中のわずか1%~10%の細胞がトランスフェクションされるのみである。従ってベクター産生細胞株の効率と力価を最適化するために、2つの連続的工程が行われる。これを行うために、まずベクターを一次アルファウイルスパッケージング細胞株にトランスフェクションする。次にこのトランスフェクションした細胞株は、培養上澄液中に低力価の感染性ウイルス粒子を産生する。次にこれらの感染性上澄液を用いてアルファウイルスパッケージング細胞の単層を形質導入する。パッケージング細胞株へのアルファウイルスベクターの感染は、RNAの移動効率が高いことと細胞内にベクターが最適化されて入れられるためトランスフェクションより好ましい。この2段階アプローチにより、パッケージングされた感染性組換えシンドビスウイルスベクターのより高い発現とより高い力価が得られる。

本発明のいくつかの実施態様において、細胞株はアルファウイルスベクターの付着のための細胞性リセプターを阻止する細胞性エンベロップ蛋白の産生が増加しているため、アルファウイルス粒子は同じパッケージング細胞株を形質導入しない。そのような場合アルファウイルスパッケージング細胞に感染することができる第2の型のアルファウイルス粒子が作成される。インビトロで転写したアルファウイルスRNAベクター転写体でトランスフェクションされた結果一時的なウイルス粒子を産生する「ホッピング細胞株」として知られているパッケージング細胞株により、この第2の型のウイルス粒子は産生されなければならない。このホッピング細胞株は、疑タイピング(pseudo-typing)と呼ばれる工程でアルファウイルスベクターを、異なる細胞リセプターに再指向させるアルファウイルスエンベロップ蛋白を提供することにより一時的に産生されたウイルス粒子の親和性を再指向させるように作成される。現在アルファウ

イルスベクター粒子の疑タイピングのために2つのアプローチが作成されている。最初のアプローチは、水胞性口内炎ウイルス-G蛋白(VSV-G)を同時発現するアルファウイルスパッケージング細胞株(前述)よりなる。このVSV-G疑タイピングは広範な細胞株を感染することが証明されている(Marsh, Adv. Virus Res. 36:107-151, 1989)。しかしタイピングされたアルファウイルスベクター粒子を産生する第2のアプローチは、レトロウイルスパッケージング配列を含有するアルファウイルスRNAベクターをパッケージングすることができるレトロウイルスgag/polとenv配列を含有するレトロウイルスパッケージング細胞株(例えば、W092/05266)を使用することである。

本発明の別の面において、自己複製する能力を維持するアルファウイルスベクターRNA分子を産生するために、安定に取り込まれたアルファウイルスDNA発現ベクターが使用される。取り込まれたDNAは変化していないRNAベクターを構成的に(constitutively)発現するため、このアプローチは培養の長期間にわたって高い発現レベルを維持するのに有用であるかも知れない。この形状ではSP6RNAポリメラーゼ認識部位を含有するプラスミドからあらかじめ転写されたベクターは、使用される親細胞株に規定される適切なプロモーター配列で置換される。このプラスミド配列はまた、パッケージング細胞株を作成するために使用されるものとは異なる選択マーカを含有してもよい。この形状では前述したように、DNAをベースにしたアルファウイルスベクターはトランスフェクションによりパッケージング細胞株に導入され、次に最大の力価を示す細胞株に希釈クローニングされる。

### 1. 自殺ベクター

本発明の1つのさらなる面は、パッケージング/プロデューサー

細胞株中の野生型アルファウイルスの拡散を制限するためのアルファウイルス自殺ベクターの発現に関する。簡単に説明すると1つの実施態様において、アルファウイルス自殺ベクターは、ベクターの結合領域の3'配列とパッケージング細胞株発現ベクターの5'アルファウイルス構造配列の間のRNA組換えにより産生される、野生型アルファウイルス配列に特異的なアンチセンスまたはリボザイム



配列よりなるであろう。アンチセンスまたはリボザイム配列は特異的組換え配列の存在下でのみ熱安定性があり、アルファウイルスパッケージング／プロデューサー細胞株には他の影響はないであろう。あるいは毒性分子（前述のようなもの）を、野生型アルファウイルスの存在下でのみ発現するであろうベクターの中で発現してもよい。

## 2. 転移癌の進展を防止するためのアルファウイルスベクター

本発明の1つのさらなる面は、悪性新生物の侵襲性を阻害または低下させるためのアルファウイルスベクターの使用に関する。簡単に説明すると悪性の程度は典型的には癌の血管新生に関連する。癌の血管新生の1つの原因は、いくつかの癌により発現される可溶性の癌血管形成因子(TAF)の産生である(Pawelietzら、Crist. Rev. Oncol. Hematol. 9:197, 1989)。本発明の1つの面において、癌の血管新生は、TAFに特異的なアンチセンスまたはリボザイムRNA分子を発現するアルファウイルスベクターを用いて遅らせることができる。あるいは癌の血管新生を遅らせるかまたは阻害するために、抗血管新生因子(Mosesら、Science 248:1408, 1990; Shapiroら、PNAS 84:2238, 1987)を単独か、または前述のリボザイムまたはアンチセンスと組合せて発現することができる。あるいは周囲の組織のTAFリセプターに特異的な抗体を発現させるために、アルファウイルスを使用することもできる。

## H. アルファウイルスベクターの使用法

### 1. 免疫刺激

本発明の1つの面において、感染性、癌性、自己免疫性または免疫疾患を防止、阻害、安定化または逆転写するすることができるアルファウイルスベクター作成体の投与のための組成物と方法が提供される。このような疾患の代表例には、HIV、HBV、HTLV I、HTLV II、CMV、EBV、およびHPVのような感染症、メラノーマ、糖尿病、移植片対宿主反応疾患、アルツハイマー病および心臓疾患などがある。

さらに詳しくは本発明の1つの面において、病原体が死滅または阻害されるように、病原体に対する免疫応答（体液性または細胞性）を刺激するための組成物

と方法が提供される。病原体の代表例には、細菌、カビ、寄生体、ウイルスおよび癌細胞がある。

本発明の1つの実施態様において、病原体はウイルスであり、(1)ウイルス抗原に対する免疫応答を開始させるか、または(2)ウイルスの相互作用に必要な細胞リセプターを占有することによりウイルスの拡散を防止するすることができる感受性のある標的細胞に、ベクター作成体を指向させるように設計された組換えアルファウイルス粒子を用いることにより、特異的免疫応答を刺激しそしてウイルスの拡散を阻害するための方法が提供される。ベクターの核酸にコードされた蛋白の発現は一時的であるか、または時間が経過しても安定化である。病原体抗原に対する免疫応答が刺激される場合、組換えアルファウイルスは好ましくは、免疫応答を刺激しかつ未変性の抗原に対して病原性が低下している、修飾された型の抗原を発現するように設計される。この免疫応答は細胞が正しい方法、すなわち、MHCクラスIおよび/またはII分子とCD3, ICAM-1, ICAM-2, LFA-1、またはこれらの類似体のような付属分子とともに

抗原を指示するとき達成される(例えば、Altmanら、Nature 338:512, 1989)。アルファウイルスベクターで感染した細胞は真のウイルス感染を厳密に模倣し、そしてこれらは、(a)複製していない細胞に感染することができ、(b)宿主細胞ゲノム内に取り込まれなく、(c)いかなる致死的疾患にも関係がなく、そして(d)高レベルの異種蛋白を発現するため、アルファウイルスベクターで感染した細胞は前記免疫応答を効率的に行うことが予想される。これらの違いのために、アルファウイルスベクターはワクチンとしての利用のための健康人に対して安全なウイルスベクターとして容易に考えられる。

提示細胞が完全に生存しており、健康であり、異種遺伝子に比較して低レベルのウイルス抗原が発現されるという点で、本発明のこの面は同様に機能すると予想される他の系に対してさらなる利点を有する。発現される抗原性エピトープは、抗原の遺伝子のサブ断片の組換えアルファウイルスへの選択的クローニングにより変更でき、従って他の場合には免疫原性が優勢なエピトープに隠されてしまう免疫原性エピトープに対する応答が得られるため、これは顕著な利点を有する

。このようなアプローチは複数のエピトープ（このエピトープの1つまたはそれ以上は、異なる蛋白由来である）を有するペプチドの発現に拡張することができる。さらに本発明のこの面は、細胞内合成およびこれらのペプチド断片とMHCクラスI分子との会合を介する、抗原性エピトープおよび遺伝子のサブ断片にコードされる抗原のペプチド断片に対する細胞毒性Tリンパ球(CTL)の効率的な刺激を可能にする。このアプローチはCTL誘導のための主要な免疫優勢エピトープをマッピングするのに利用できる。

目的の抗原を認識する特異的T細胞リセプターの遺伝子（必要な場合は適切なMHC分子を用いて）、目的の抗原を認識する免疫グロブリン遺伝子、

またはMHCの非存在下でCTL応答を与える2つのハイブリッドのうちの1つの遺伝子を、適当な免疫細胞（例えばTリンパ球）に移動させることによって、免疫応答を達成することができる。すなわち組換えアルファウイルス感染細胞は、免疫刺激剤、免疫調節剤またはワクチンとして使用できる。

本発明の別の実施態様において、アルファウイルスベクターが、ウイルスの集合を阻害する欠陥のある妨害性ウイルス構造蛋白を送達または発現する、阻害剤または緩和剤を産生するための方法が提供される。このようなベクターは、欠陥のあるgag、pol、envまたは他のウイルス粒子蛋白またはペプチドをコードし、ウイルス粒子の集合を主体に阻害する。これは、ウイルス粒子の正常なサブユニットの相互作用が欠陥のあるサブユニットとの相互作用により乱されるために発生する。

本発明の別の実施態様において、ウイルスプロテアーゼに特異的な阻害性ペプチドまたは蛋白の発現方法が提供される。簡単に説明すると、ウイルスプロテアーゼはウイルス性gag、およびgag/pol蛋白をいくつかの小さいペプチドに切断する。この切断がないと、すべての場合に感染性レトロウイルス粒子の産生が完全に阻害される。例としてHIVプロテアーゼはアスパルチルプロテアーゼとして知られており、これらは蛋白または類似体からのアミノ酸から作成されるペプチドにより阻害されることが知られている。HIVを阻害するベクターは、このようなペプチド阻害剤の1つまたは複数の融合したコピーを発現する。

別の実施態様は、細胞型の中で欠失、突然変異または発現されない時、その細胞型の中で癌原性による抑制遺伝子の送達に関する。ウイルスベクターによる欠失した遺伝子の再導入により、これらの細胞の癌表現型は退縮する。このような癌の例は網膜芽細胞腫とWi

lms癌である。いくつかの悪性腫瘍は、細胞増殖に比較して末端分化の阻害、アルファウイルスベクター送達の阻害、そして癌の分化または一般的には退縮へつながらる遺伝子生成物の発現の阻害であると考えられている。

さらに別の実施態様において、アルファウイルスベクターは、病原性機能に対応するRNA分子を切断従って不活性化するリボザイム（RNA酵素）をコードすることにより治療効果を提供する（Haseloff and Gerlach, Nature 334:585, 1989）。リボザイムは標的RNA中の特異的配列を認識することにより機能し、この配列は通常12～17塩基対であるため、これはRNAまたはレトロウイルスゲノムのような特定のRNA種を認識することができる。

ある場合には、これを条件的毒性緩和剤とすることにより追加の特異性が達成される（後述）。

阻害性緩和剤の効果を上昇させる1つの方法は、問題のウイルスにより耐性細胞の感染の可能性を上昇させる遺伝子の発現とともに、ウイルス性阻害性遺伝子を発現することである。その結果は、増殖性感染に競合する非競合的「行き止まり」である。HIVの具体例では、HIV複製を（前述のアンチセンスtatなどを発現することにより）阻害し、かつCD4のような感染に必要な蛋白を過剰に発現するベクターが送達される。こうして比較的少数のベクター感染HIV耐性細胞は、遊離のウイルスまたはウイルスの感染した細胞による多数の非増殖性融合の「巣」または「磁石」として作用する。

## 2. ブロックング剤

多くの感染性疾患、癌、自己免疫疾患、および他の疾患には、ウイルス粒子と細胞、細胞と細胞、または細胞と因子の相互作用が関与する。ウイルス感染では、ウイルスは普通感受性のある細胞表面のリセプターを介して細胞に入る。癌では、細胞は他の細胞または

因子からのシグナルに不適当に応答するかまたはまったく応答しない。自己免疫疾患では、「自己」マーカーが不適切に認識される。本発明においてそのような相互作用は、相互作用のいずれかの相手に対する類似体をインビボで産生することによりブロックされる。

このブロック作用は細胞内、細胞膜上、または細胞外で起きる。ブロッキング剤を有するウイルス（特にアルファウイルスベクター）のブロッキング作用は、感受性細胞の内部から、または病原性相互作用を局所的にブロックするブロック蛋白の一種を分泌することにより介在される。

HIVの場合、相互作用の2つの物質はgp120/gp41エンベロープ蛋白とCD4リセプター分子である。すなわち適当なブロッカーは、病原作用を示さずHIVの侵入をブロックするHIV env類似体か、またはCD4リセプター類似体を発現するベクター作成体であろう。CD4類似体は隣接の細胞を保護するように分泌され機能し、gp120/gp41はベクター含有細胞のみを保護するように、分泌されるかまたは細胞内でのみ産生される。安定性を上げるかまたは補体溶解性を向上させるために、CD4に免疫グロブリン重鎖かまたは他の成分を加えることが有利である。そのようなハイブリッド可溶性CD4をコードするアルファウイルスベクターの宿主への送達により、安定なハイブリッド分子が連続的に供給される。治療の効果は、抗体レベル、ウイルス抗原産生、感染性HIVレベル、または非特異的感染のレベルなどの、疾患進行の通常の指標を測定することにより測定できる。

### 3. 緩和剤の発現

病原体または遺伝子の機能を阻害することができる物質（すなわち「緩和剤」）の発現を指令することができるベクター作成体により組換えアルファウイルスを産生するのに、前述の方法と類似の方

法を使用することができる。本発明において「機能を阻害することができる」とは、緩和剤は直接機能を阻害するか、または例えば細胞中に存在する物質を、通常は病原体の機能を阻害しないものから機能を阻害するものに交換することにより間接的に阻害することを意味する。ウイルス疾患のそのような例には、吸収、複製、遺伝子発現、集合、および感染細胞からのウイルスの排出がある。癌性細

胞または癌促進性増殖因子に関するそのような機能の例には、生存性(viability)、細胞複製、外部シグナルに対する感受性の変化(例えば、接触阻害)、および産生の欠如または抗癌遺伝子蛋白の突然変異型の産生がある。

(a) 阻害緩和剤

本発明の1つの面において、アルファウイルスベクター作成体は、例えばウイルス疾患または悪性腫瘍疾患における病原体の機能を妨害する遺伝子の発現を指令する。そのような発現は基本的に連続的であるか、または細胞中の病状または特定の細胞型(「同定物質」)に関連する他の物質の存在に応答して起きる。さらにベクターの送達は、前述したようにベクターの侵入を具体的に目的の細胞型(例えば、ベクター感染細胞または悪性腫瘍細胞)にターゲティングすることにより制御される。

投与の1つの方法は白血球伝達(leukopheresis)であり、ここでは個人の約20%のPBLが取り出され、インピトロで操作される。すなわち約 $2 \times 10^9$ 個の細胞が治療され置換される。繰り返し治療も行われる。あるいは骨髓が治療され、前述のように増殖される。さらにベクターを産生するパッケージング細胞株は対象者に直接注射され、組換えウイルス粒子が連続的に産生される。

1つの実施態様において、主要な病原体遺伝子転写体の蛋白への翻訳を阻害(例えば、HIV tat蛋白の翻訳の阻害)ために、そのよ

うな病原体遺伝子転写体(例えば、ウイルス遺伝子生成物または活性化細胞性癌遺伝子)に相補的なRNAを発現するアルファウイルスベクターが使用される。この蛋白の発現はウイルス複製に必須であるため、ベクターを含有する細胞はHIV複製に耐性であろう。

病原体はパッケージングシグナルを有す1本鎖ウイルスである2つめの実施態様において、ウイルスパッケージングシグナル(例えば、緩和剤がHIVに対する時はHIVパッケージングシグナル)に相補的なRNAが発現され、その結果これらの分子とウイルスパッケージングシグナルとの会合は、レトロウイルスの場合はアルファウイルスRNAゲノムの正しいカプシッド化(encapsidation)または複製に必要な、幹ループ形成またはtRNAプライマー結合を阻害する。

3つめの実施態様において、病原体遺伝子の発現を選択的に阻害することができる緩和剤、または病原体により産生される蛋白の活性を阻害することができる緩和剤を発現するアルファウイルスベクターが導入される。HIVの場合1つの例は、HIV LTRからの発現をトランス活性化する能力が欠如しており、tat蛋白の正常な機能を（トランスドミナントに）妨害する突然変異tat蛋白である。このような突然変異体はHTLV II tat蛋白と同定された（「X II Leu<sup>s</sup>」突然変異体；Wachsmanら、Science 235: 674, 1987を参照）。突然変異体のトランスリプレッサーtatは、HSV-1で類似の突然変異体リプレッサーについて示されたように複製を阻害するはずである（Friedmanら、Nature 335: 452, 1988）。

このような転写リプレッサー蛋白は、その発現がウイルス特異的トランス活性化蛋白（前述）により刺激される、ウイルス特異的転写プロモーターを用いて組織培養で選択される。HIVの具体的なケースでは、HIV tat蛋白を発現する細胞株とHIVプロモーターに支配されるHSVTK遺伝子は、ACVの存在下で死滅する。しかしもしこの細胞株が突然変異したtat蛋白を発現するならば、ACVの存在下で生存する。

この系に一連の突然変異したtat遺伝子が導入されるなら、適切な性質（すなわち、野生型tatの存在下でHIVプロモーターからの転写を抑制する）を有する突然変異体が増殖し選択されるであろう。次にこの突然変異遺伝子はこれらの細胞株から単離される。生存している細胞クローンはこれらの遺伝子の内因性突然変異により引き起こされるのではないことを確認するために、条件的に致死的ベクター／tat系の複数のコピーを含有する細胞株を使用することができる。次に「レスキューが可能な」アルファウイルスベクター（すなわち、突然変異tat蛋白を発現し、細菌内での増殖と選択のために細胞由来の複製および薬剤耐性マーカーを含有するもの）を用いて、これらの細胞に一群のランダムに突然変異したtat遺伝子が導入される。これにより多数のランダム突然変異を評価することができ、目的の突然変異細胞株の以後の分子クローニングが容易になる。この方法は、抗ウイルス療法の可能性のための種々のウイルス性転写アクチベータ／ウイルスプロモーター系における突然変異を同定し利用するために使用できる。

#### 4. 条件的毒性緩和剤

病原体を阻害する別のアプローチは、病原性条件を発現する細胞にとって毒性の緩和剤を発現することである。この場合ベクターからの緩和剤の発現は、非病原性細胞の破壊を避けるために、病原体に関連した物質（例えば特異的ウイルスRNA配列）の存在により制限される。

この方法の1つの実施態様において、組換えアルファウイルスベクターは、細胞特異的応答性ベクターから発現される毒性遺伝子（前述）を含有するベクター作成体を含有する。この方法で、細胞特異的応答性ベクターを活性化することができるRNA配列を含有する、急速に複製している細胞は、アルファウイルスベクター作成体に

より産生される細胞毒性物質により優先的に破壊される。

前記の実施態様と同様の方法で、アルファウイルスベクター作成体はリン酸化、ホスホリボシル化、リボシル化、またはプリンまたはピリミジンベースの薬剤の他の代謝のための遺伝子を有することができる。この遺伝子は哺乳動物に類似体がなくてもよく、またウイルス、細菌、または原性動物のような微生物由来でもよい。この1つの例は、チオキサンチンの存在下で致死である、大腸菌のグアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子生成物である（Besnardら、Mol. Cell. Biol. 7 : 4139-4141, 1987）。この型の条件的致死的遺伝子生成物（前述のように「プロドラッグ」とも呼ぶ）は、多くの公知のプリンまたはピリミジンベースの抗癌剤への用途を有し、有効な細胞毒性物質であるためにしばしば細胞内リボシル化またはリン酸化を必要とする。この条件的致死的遺伝子生成物はまた、プリンまたはピリミジン類似体ではない非毒性薬剤を細胞毒性型に代謝する（Searleら、Brit. J. Cancer 53 : 377-384, 1986）。

一般的に哺乳動物ウイルスは、他のウイルスプロモーター成分からの以後の転写活性化に必要な「極初期」（“immediate early”）遺伝子を有することが多い。この性質を有するRNA配列は、ウイルス感染のアルファウイルスベクター細胞シグナル（または「同定物質」）を活性化するための優れた候補である。すなわち、これらのウイルス性「極初期」遺伝子生成物に応答するアルファウイルス細胞特異的ベクターから発現される条件的致死的遺伝子は、任意の特定のウイル



スに感染された細胞を死滅させるであろう。さらにヒト $\alpha$ および $\beta$ インターフェロンプロモーター成分は、広範な非関連ウイルスにより転写的に活性化されるため、インターフェロン産生に応答してHSVTKのような条件的致死的遺伝子生成物を発現するべ

クターの導入により、種々の異なるウイルスに感染した細胞が破壊される。

本発明の別の面において、組換えアルファウイルスウイルスベクターは、他の場合には不活性な前駆体を病原体の活性な阻害剤に活性化することができる、遺伝子生成物の発現を指令するベクター作成体を有する。例えばHSVTK遺伝子生成物は、AZTやddCのような抗ウイルス活性の可能性のあるヌクレオチド類似体をより有効に代謝するために使用される。HSVTK遺伝子は細胞特異的応答性ベクターの制御下で発現され、これらの細胞型に導入される。AZT（および他のヌクレオシド抗ウイルス剤）はレトロウイルス逆転写酵素を特異的に阻害し、従ってHIV複製を特異的に阻害するために、細胞性機構によりヌクレオチド三リン酸型に代謝されなければならない(Furmanら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8333-8337, 1986)。HSVTK（非常に広い基質特異性を有するヌクレオシドおよびヌクレオシドキナーゼ）の構成的（constitutive）発現により、これらの薬剤はより有効にその生物活性のある三リン酸型に代謝される。従ってAZTまたはddC療法は、より効果的であり、投与量は少なく、全身への毒性は低く、増殖性感染に対して高い力価を有する。そのヌクレオシド三リン酸型がレトロウイルス逆転写酵素に対して選択性を示すが、細胞性ヌクレオシドおよびヌクレオシドキナーゼの基質特異性の結果リン酸化されない追加のヌクレオシド類似体は、より効果的にすることができるであろう。

これらの抗ウイルスベクターのヒトT細胞およびマクロファージ/単球細胞株への投与は、レトロウイルスベクター治療のない同じ細胞より、AZTやddCの存在下でHIVに対して耐性を上昇させる。AZTによる治療は毒性の副作用を避けるため通常より低濃度であるが、それでもHIVの増殖を有効に阻害する。治療のコースはブロッ

カーについて前述したものと同様である。

1つの実施態様において、組換えアルファウイルスベクターは、それ自身毒性はないが、ウイルスまたは他の病原体に特異的なプロテアーゼのような蛋白により処理または修飾されると毒性型に変換される生成物を規定する遺伝子を含有する。例えば組換えアルファウイルスは、リシンA鎖のプロ蛋白をコードする遺伝子を含有するが、これはHIVプロテアーゼによる処理により毒性になる。さらに詳しくは、毒素リシンまたはジフテリアA鎖の合成的に不活性なプロ蛋白型は、HIVにコードされたプロテアーゼが認識し易いように再配置し、適当な「プロ」成分を切り離すことにより、活性型に切断することができる。

別の実施態様において、アルファウイルスベクターは、細胞内の同定物質の存在（例えば、ウイルス遺伝子の発現）に応答して標的細胞の表面に「レポーティング生成物」を発現する。この表面蛋白は、レポーティング蛋白または細胞毒性T細胞のような細胞毒性物質により認識される。同様にこのような系は、同定蛋白を発現する特定の遺伝子を有することこれらの細胞を単純に同定するための検出系（後述）として使用できる。

同様に別の実施態様において、それ自身が治療的に有効である表面蛋白が発現される。HIVの特定の場合に、HIV感染細胞中に特異的にヒトCD4蛋白が発現されることは2つの意味で有益である：

1. 可溶性CD4が遊離のウイルスについて阻害することが証明されているように、細胞内でのHIV envへのCD4の結合は、生存活性のあるウイルス粒子の形成を阻害するが、この蛋白は膜に結合したままであり構造的に内因性CD4（患者はこれには免疫学的に寛容（tolerant）である）と同じであるため、全身性のクリアランスおよび免疫原性の問題はない。

2. CD4/HIV複合体は細胞死の原因であるとされているため、（HIV感染細胞中の過剰のHIV-envの存在下で）CD4の追加の発現はさらに急速な細胞の死を引き起こし、従ってウイルス拡散を防止する。これは特に、HIV誘導細胞毒性に対して比較的耐性がある結果（これは細胞表面にCD4が比較的少ないためである）ウイルス産生の受け器として作用する単球やマクロファージに特に応用できる。

別の実施態様において、アルファウイルスベクターは、ベクターに感染した細胞の生存性に必須のRNA分子を切断し不活性化するリボザイムをコードする。リボザイム産生を病原性の状態(例えば、HIV tat)に対応して特定のRNA配列に依存するようにすることにより、毒性が病原性状態に特異的になる。

## 5. マーカーの発現

特異的RNA配列に応答して細胞中の緩和剤を発現する前述の方法は、同定蛋白を発現する細胞中で特定の遺伝子(例えば、特定のウイルスが有する遺伝子)を検出できるように、従ってそのウイルスを有する細胞を検出できるように修飾することもできる。さらにこの方法は、ウイルスに関連する同定蛋白を有する細胞の臨床試料中のウイルス(例えば、HIV)の検出を可能にする。

感染細胞中で同定蛋白の存在に応答するアルファウイルスベクター中で、その存在が容易に同定される生成物(「マーカー生成物」)をコードするゲノムを提供することにより、この修飾は容易に実施される。例えば、HIVは適当な細胞に感染するとき、tatとrevを作る。この指示細胞は、tatおよび/またはrevRNA転写体による活性化によって、組換えアルファウイルスにより発現されるマーカー遺伝子(例えばアリカル性ホスファターゼ遺伝子、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、またはルシフェラーゼ遺伝子)をコードするゲノム(例えば、適当な組換えアルファウイルスによる感染)に与えられる。

$\beta$ -ガラクトシダーゼまたはアルカリ性ホスファターゼの場合、細胞を基質類似体に接触させると、試料がHIV陽性の場合には色または蛍光が変化する。ルシフェラーゼの場合は試料をルシフェリンに接触させることにより、試料がHIV陽性の場合発光する。 $\beta$ -ガラクトシダーゼのような細胞内酵素の場合、着色細胞または蛍光細胞を計測するか、または細胞抽出物を作成して適切な測定法を行うことにより、ウイルスの力価を直接測定することができる。膜結合型のアルカリ性ホスファターゼの場合、蛍光性基質を用いて細胞表面で酵素測定法を行うことによりウイルスの力価を測定することができる。分泌された酵素(例えば操作された型のアルカリ性ホスファターゼ)については、少量の培養上澄液の活性を測定することにより、単一の培養の経時変化を追跡できる。すなわち異なる目的に異なる

る型のこのマーカー系を使用することができる。これらには活性のあるウイルスの計測、培養中のウイルスの増殖の単純な測定、そして種々の薬剤によるこの増殖の阻害を含む。

このウイルスに対する中和抗体の存在下または非存在下で、ウイルスの存在を試験することにより、前記の系にさらなる特異性を与えることができる。例えば試験する臨床試料の一部については中和抗体が存在するが、別の部分では中和抗体がまったく存在しないこともある。抗体があるところでこの試験が陰性であり、抗体がないところで試験が陽性的場合、これはHIVの存在を確認する補助になる。

インビトロ測定法の類似の系で、特定の遺伝子（例えばウイルス遺伝子）の存在は、細胞試料で測定される。この場合試料の細胞は、適当なウイルスRNA転写体の存在下でのみ発現されるレポーター遺伝子を有する適当なアルファウイルスベクターで感染させる。レポーター遺伝子は試料細胞に入った後、宿主細胞が適当なウイルス

蛋白を発現する場合のみ、レポーター生成物（例えば $\beta$ -ガラクトシダーゼまたはルシフェラーゼ）を発現する。

レポーター遺伝子は存在する同定物質よりもより多くのレポーター生成物を発現し、増幅効果が得られるため、これらの測定法はより迅速で好感度である。

## 6. 免疫ダウンレギュレーション

簡単に前述したように、本発明はアルファウイルスに感染した標的細胞中の免疫系の1つまたはそれ以上の成分を抑制することができるベクター作成体を有する組換えアルファウイルスを提供する。

簡単に説明すると、不適当なまたは好ましくない免疫応答（例えば慢性肝炎、または骨髄のような異種組織の移植）の特異的ダウンレギュレーションは、移植(MHC)抗原の表面発現を抑制する免疫抑制性ウイルス遺伝子生成物を用いて操作できる。C群アデノウイルスAd2とAd5は、ウイルスのE3領域にコードされる19kd糖蛋白(gp19)を有する。このgp19分子は細胞の小胞体中のクラスI MHC分子に結合し、細胞表面に対するクラスI MHCの末端グリコシル化と細胞表面への移動

を防止する。このドナー細胞の移植の移植片拒絶の危険性は小さく、移植患者の免疫抑制療法は最少でよい。このためほとんど合併症もなく、ドナー受容個体の許容されるキメラ状態が存在する。いわゆる自己免疫疾患（例えば、ループスエリテマトーデス、多発性硬化症、リウマチ様関節炎または慢性B型肝炎感染）を治療するのに、同様の治療法が使用できる。

別の方法は、自然界で自己反応性のT細胞クローンに特異的な、アンチセンスメッセージ、リボザイムまたは他の特異的遺伝子発現阻害剤を使用する。これらは、自己免疫応答に関与する特定の好ましくないクローンのT細胞リセプターの発現をブロックする。このアンチセンス、またはリボザイムまたは他の遺伝子は、ウイルスベクターを用いて導入される。

7. 置換または増強遺伝子療法

本発明のさらに1つの面は、治療用蛋白を発現することができる遺伝子配列を

与えるための、遺伝子移動の運搬体として作用する組換えアルファウイルスベクターによる、動物細胞の形質転換に関する。本発明の1つの実施態様において、

ウイルスベクター作成体は、代謝、免疫制御、ホルモン制御、酵素的または膜関

連構造機能における、遺伝性または非遺伝性の遺伝子欠陥を防止、阻害、安定化

または逆転写することができる治療用蛋白を発現するように設計される。この実施態様はまた、各細胞を形質導入することができるウイルスベクターを記載し、

これにより治療用蛋白が特定の細胞または組織から全身的にまたは局所的に発現

され、これにより治療用蛋白は（a）存在しないかまたは欠陥のある細胞性蛋白

または酵素の置換、または（b）欠陥のあるかまたは発現量の少ない細胞性蛋白

または酵素の補充産生が可能である。このような疾患には、嚢胞性繊維症、パー

キンソン病、高コレステロール血症、アデノシンデアミナーゼ欠損症、 $\beta$ -グロビン疾患、血友病AおよびB、ゴーシェ病、糖尿病および白血病がある。

本発明の1つの例として、ゴーシェ病の治療に組換えアルファウイルスベクターが使用される。簡単に説明するとゴーシェ病は酵素グリコセレブロシダーゼの欠損を特徴とする遺伝子疾患である。この型の治療は、機能性細胞性酵素を与え

ることによる単一の遺伝子置換療法の1つの例である。この酵素の欠損により、体内のすべての細胞のリソゾームにグルコセレブロシドが蓄積する。しかしこの疾患の表現型は、非常にまれな神経障害の場合を除いて、マクロファージにのみ現れる。この疾患では通常肝臓と脾臓そして骨の病変部が拡大する（総説については、Science 256:794, 1992および

The Metabolic Basis of Inherited Disease、第6版、Scriberら、第2巻、p. 1677を参照）。

## 8. アルファウイルス粒子の投与

本発明の1つの面において、組換えアルファウイルスベクターまたは粒子の投与法が提供される。簡単に説明すると、ウイルスベクター投与の最終モードは、特定の治療応用、ベクターの力価を上昇させる最良の方法、および最も便利な投与法に依存する。一般的に本実施態様は、（1）血流への直接注入、（2）特定の組織または癌への直接注入、（3）経口投与、（4）鼻内吸入、（5）粘膜組織への直接適用、（6）動物への形質導入した自己細胞の体外投与により、送達されるように設計されることができる組換えアルファウイルスベクターを含む。すなわち治療用アルファウイルスベクターは、ベクターが（a）正常な健常細胞を形質導入しかつ細胞を形質転換して、全身性または局所的に分泌される治療用蛋白または物質のプロデューサーにする、（b）異常または欠陥のある細胞を形質転換して、細胞を正常に機能する表現型にする、（c）異常な細胞を破壊されるように形質転換する、および／または（d）細胞を形質導入して免疫応答を操作することができるように、投与することができる。

### 1. 転写因子活性の制御

さらに別の実施態様において、アルファウイルスベクターは感染細胞の転写因子の増殖制御活性を制御するのに使用することができる。簡単に説明すると、転写因子は配列特異的トランス活性化または抑制を介して、遺伝子発現のパターンに影響を与える(Karin, New Biologist 21:126-131, 1990)。すなわち、突然変異した転写因子が一群の癌遺伝子になることは驚くべきことではない。アルファウイルス遺伝子移行療法は例えば、その無制御な増殖が癌遺伝子

性転写因子により活性化される癌細胞、そしてホモまたはヘテロダイマーのトランス活性化または抑制性転写因子複合体の形成に共同して結合を促進または阻害する蛋白を制御するのに使用される。

細胞増殖を逆転させる1つの方法は、c-myc/Maxヘテロダイマー転写因子複合体のトランス活性化の可能性を阻害することであろう。簡単に説明すると、核性癌遺伝子c-mycは細胞を増殖させることにより発現され、いくつかの顕著な機構(レトロウイルス挿入、増幅、および染色体転座を含む)により活性化される。

Max蛋白は静止細胞中で発現され、c-mycとは独立に、単独でまたは未同定の因子とともに発現され、myc/Maxヘテロダイマーにより活性化されるものと同じ遺伝子の発現を抑制するように作用する(Cole, Cell 65: 715-716, 1991)。

癌細胞のc-mycまたはc-myc/Max増殖の阻害は、アルファウイルスベクターにより制御される標的細胞中でMaxを過剰発現させることにより行われる。Max蛋白はわずか160アミノ酸(長さが480ヌクレオチドのRNAに相当する)であり、独立でまたは細胞の増殖制御を放出する因子にターゲティングされた他の遺伝子および/またはアンチセンス/リボザイム部分とともにアルファウイルスベクターに取り込まれる。

ホモ/ヘテロ複合体会合の修飾は、転写因子活性化遺伝子発現を制御するための別のアプローチである。例えばトランス活性化転写因子NF- $\kappa$ Bの細胞質から核への移行は、阻害蛋白I $\kappa$ Bとともにヘテロダイマー複合体中にある時防止される。種々の物質(ある種のサイトカインを含む)による誘導により、I $\kappa$ Bはリン酸化され、NF- $\kappa$ Bは放出され核に移行され、ここで配列特異的トランス活性化機能を示す(Baeuerle and Baltimore, Science 242: 540-546, 1988)。NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B複合体の解離は、I $\kappa$ Bのリン酸化部

位を抗体でマスクすることにより防止できる。このアプローチは、核への移行を防止することにより、NF- $\kappa$ B転写因子のトランス活性の活性化を有効に阻害できるであろう。標的細胞中のI $\kappa$ Bリン酸化部位特異的抗体または蛋白の発現は、アルファウイルス遺伝子移行ベクターを用いて行われる。ここに記載した方法と類似のアプローチは、junとfos蛋白の間の会合を阻害することにより、トラン

ス活性化転写ヘテロダイマー因子AP-1の形成を防止するのに使用されるであろう(Turner and Tijan, Science 243:1689-1694, 1989)。

#### J. 薬剤組成物

前述のように、本発明はまた、薬剤学的に許容される担体、希釈剤、または受容体とともに、組換えシンドビス粒子またはウイルス、またはシンドビスベクター作成体よりなる組成物も提供する。

簡単に説明すると、感染性組換えウイルス(粒子とも呼ぶ)は、粗製な型または純粋な型で保存される。粗製な型でウイルスを産生するために、ウイルス産生細胞をまずバイオリアクターで培養し、ウイルス粒子を細胞から培地へ放出させる。次にまず組換えウイルスを含有する培地に充分量の調製緩衝液を加えて水性懸濁液を作成することにより、ウイルスを粗製の型で保存する。いくつかの好適な実施態様において、調製緩衝液は糖、高分子量構造添加剤、および緩衝化成分を水中に含有する水溶液である。この水溶液はまた、1つまたはそれ以上のアミノ酸を含有してもよい。

組換えウイルスも精製された形で保存される。さらに詳しくは調製緩衝液の添加前に上記の粗組換えウイルスをフィルターに通して清澄化し、次に向流濃縮系(フィルترون・テクノロジー社(Filtron Technologies Corp.)、Northborough、マサチューセッツ州)などにより濃縮する。1つの実施態様において、DNaseを濃縮物に

加えて外来DNAを消化する。次に消化物を濾過して過剰の培地成分を除去し、さらに好ましい緩衝液中で組換えウイルスを確立する。次に濾過物をセファデックスS-500ゲルカラムに通して、精製した組換えウイルスを溶出させる。次にこの溶出液に充分量の調製緩衝液を加えて目的の最終成分濃度にし、組換えウイルスの希釈を最小にする。次に水性懸濁液を好ましくは-70℃で保存し、直ちに乾燥する。前述のように、調製緩衝液は糖、高分子量構造添加剤、および緩衝化成分を水中に含有する水溶液でもよい。この水溶液はまた1つまたはそれ以上のアミノ酸を含有してもよい。

粗組換えウイルスはまたイオン交換カラムクロマトグラフィーにより精製され



る。簡単に説明すると粗組換えウイルスをまずフィルターに通し、次に濾液を高度にスルホン化したセルロースマトリックスを含有するカラムにのせる。次に高塩緩衝液を用いて組換えウイルスを精製した形でカラムから溶出させ、溶出液を分子量排除カラムに通すことにより高塩緩衝液をより好ましい緩衝液に交換する。次に前述のように精製した組換えウイルスに充分量の調製緩衝液を加え、水性懸濁液を直ちに乾燥させるかまたは好ましくは $-70^{\circ}\text{C}$ で保存する。

粗または精製された型の水性懸濁液は、周囲温度で凍結乾燥または溶媒留去により乾燥される。簡単に説明すると、凍結乾燥工程は水性懸濁液をガラス遷移温度以下または水性懸濁液の共融温度以下に冷却して、昇華により冷却した懸濁液から水分を除去して凍結乾燥ウイルスを形成する。1つの実施態様において、調製した組換えウイルスの分画を凍結乾燥機 (Supermodulyo 12K) を取り付けしたEdwards Refrigerated Chamber (3 Shelf RC3S unit) に入れる。Phillipsらの記載する他段階凍結乾燥法 (Cryobiology, 18 :414, 1981) を用いて、調製した組換えウイルスを好ましくは $-40^{\circ}\text{C}$ ~ $-45^{\circ}\text{C}$ で

凍結乾燥する。得られる組成物は凍結乾燥したウイルスの10重量%未満の水を含む。いったん凍結乾燥されると、組換えウイルスは安定であり、以下に詳述されるように $-20^{\circ}\text{C}$ ~ $25^{\circ}\text{C}$ で保存される。

蒸発法において、水分は周囲温度で蒸発により水性懸濁液から除去される。1つの実施態様において、水分は噴霧乾燥により除去される (ヨーロッパ特許第520,748号)。噴霧乾燥法では水性懸濁液はあるかじめ加熱された気体流 (通常は空気) の中に入れられ、懸濁液の液滴から水分は急速に蒸発する。噴霧乾燥装置は多くの会社から入手できる (例えば、Drytec Ltd., トンブリッジ (Tonbridge)、イングランド; Lab-Plant, Ltd., ハダーフィールド (Huddersfield)、イングランド)。本明細書に記載した方法で、得られた乾燥または凍結乾燥ウイルスの水分含量は、カール-フィッシャー装置 (EM, Science Aquastar<sup>TM</sup> VIB volumetric titrator、チェリーヒル (Cherry Hill)、ニュージャージー州)、または重量法により測定される。

前述のように、調製に使用される水溶液は糖、高分子量構造添加剤、および緩

衝化成分および水よりなる。この溶液はまた1つまたはそれ以上のアミノ酸を含有してもよい。これらの成分の組合せが、凍結および凍結乾燥または蒸発による乾燥時の組換えウイルスの活性を維持するのに作用する。好適な糖は乳糖であるが、他の糖（例えば、ショ糖、マンニトール、グルコース、トレハロース、イノシトール、果糖、マルトースまたはガラクトース）を使用することもできる。さらに糖の組合せ（例えば、乳糖とマンニトール、またはショ糖とマンニトール）を使用してもよい。特に好適な乳糖の濃度は3～4重量%である。好ましくは糖の濃度範囲は1～12重量%である。

高分子量構造添加剤は凍結時のウイルスの凝集を防ぐのに役立ち

、凍結乾燥または乾燥状態での構造的支持を与える。本発明におい構造添加剤とは、もし5000分子量以上の場合には「高分子量」であると考えられる。好適な高分子量構造添加剤はヒト血清アルブミンである。しかし他の物質（例えば、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、デキストラン、セルロース、ゼラチン、またはポビドン）を使用してもよい。ヒト血清アルブミンの特に好適な濃度は0.1重量%である。好ましくは高分子量構造添加剤の濃度は0.1～10重量%の範囲である。

もしアミノ酸が存在する場合、アミノ酸は水性懸濁液の冷却および融解時のウイルス感染性を保存する働きをする。さらにアミノ酸は冷却した水性懸濁液の昇華時および凍結乾燥状態でのウイルスの感染性を保存する働きをする。好適なアミノ酸はアルギニンであるが、他のアミノ酸（例えば、リジン、オルニチン、セリン、グリシン、グルタミン、アスパラギン、グルタミン酸またはアスパラギン酸）を使用することもできる。特に好適なアルギニン濃度は0.1重量%である。好ましくはアミノ酸濃度は0.1～10重量%の範囲である。

緩衝化成分は比較的一定のpHを維持して、溶液を緩衝化する働きをする。目的のpHの範囲（好ましくは7.0と7.8の間）により種々の緩衝液が使用できる。好適な緩衝液にはリン酸緩衝液やクエン酸緩衝液がある。組合せウイルス製剤の特に好適なpHは7.4であり、好適な緩衝液はトロメタミン（tromethamine）である。

さらに水溶液は、最終の調製された組換えアルファウイルスを適当な等浸透圧

塩濃度に調整するのに使用される中性の塩を含有することが好ましい。適当な中性の塩には、塩化ナトリウム、塩化カリウムまたは塩化マグネシウムがある。好適な塩は塩化ナトリウムである。

前述の目的の濃度の成分を含有する水溶液は、濃縮した保存溶液として調製してもよい。

本明細書に開示した内容から凍結乾燥ウイルスを室温で保存する時は、水溶液中にある種の糖を使用することが好ましいことは当業者には明らかであろう。さらに詳しくは室温で保存には二糖（例えば、乳糖またはトレハロース）を使用することが好ましい。

本発明の凍結乾燥または脱水したウイルスは、種々の物質を用いて復元できるが、好ましくは水が使用される。ある場合には最終調製液を等張にする希塩溶液を使用することもできる。さらに組換えウイルスの活性を上げることが公知の成分を含有する水溶液を使用することが有利であろう。このような成分にはサイトカイン、IL-2、ポリ陽イオン（例えば硫酸プロタミン）または形質導入効率を上げる他の成分がある。凍結乾燥または脱水した組換えウイルスは、便利な量の水、または前述のように凍結乾燥または脱水試料の実質的な、好ましくは完全な溶解を可能にする復元物質により復元される。

以下の実施例は、例示のためであり、本発明を制限するものではない。

### 実施例

#### 実施例 1.

#### シンドビスゲノム長cDNAのクローニング

陽性の極性を有するRNAゲノムを有するウイルスの性質は、許容宿主(permissive host)として作用する真核細胞中に導入されると、精製されたゲノム核酸が機能性メッセージRNA(mRNA)分子として作用することである。このように、ウイルスから精製されたこのゲノムRNAは、RNAが精製された元の野生型ウイルスによる感染に特徴的な感染周期と同一の感染周期を開始することができる。

蚊(*Culex univittatus*)から単離されたシンドビスウイルスAr-339株(ATCC #

VR-1248, Taylorら、Am. J. Trop. Med. Hyg. 4 : 844 1955)を、ベビーハムスター腎臓(BHK)細胞で増殖し、低多重度で感染させる(0.1PFU/細胞)。あるいは、シンドビスウイルスhr株(リー・モレキュラー(Lee Biomolecular)、サンジエゴ・カリフォルニア州)を使用し、同一の方法で増殖させることもできる。前述のように、感染の48時間後、0℃で10%(w/v)のポリエチレングリコール(PEG-8000)で清澄化した細胞溶解物からシンドビスのビリオンが沈殿する。PEGのペレットに含まれるこのシンドビスのビリオンを2% SDSで溶解して、市販のオリゴdTカラム(インビトロジェン(Invitrogen))を使用したクロマトグラフィーによりポリ-アデニル化mRNAを単離する。下記の配列を含むオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、ポリAで選択したmRNA上でcDNAの最初の鎖の合成を2回実施した:

5'-TATATTCTAGA(dT)<sub>25</sub>-GAAATG-3' (配列番号2)

このプライマーは、5'末端に効率的な制限エンドヌクレアーゼ消化のための5個のヌクレオチドの「緩衝配列」、Xba I 認識配列、25個の連続したdTヌクレオチド、およびシンドビスの3'最末端に正確に相補的な6個のヌクレオチドを含む。このように、最初の回のcDNA合成のための選択は、2つのレベルで行う:

(1) 機能性mRNAに必須の、ポリアデニル化分子、および(2)多数のmRNA種を含有するプール中の、シンドビスmRNA分子からの選択的プライミング。さらに、逆転写を10mMのMeHgOHの存在下で行い、逆転写中の人為的停止の頻度を低くする。

元々のゲノム長シンドビスcDNAを、6対の重複するプライマーを使用して6つの別のセグメントでPCRで増幅する。ウイルスの相補的配列に加えて、シンドビス5'末端順方向プライマーは、細菌の

SP6 RNAポリメラーゼプロモーターに対応する19個のヌクレオチド配列と、5'末端に結合したApa I 制限エンドヌクレアーゼ認識配列を含む。効率的な消化のために5個のヌクレオチドの「緩衝配列」が、Apa I 認識配列の前に位置する。細菌のSP6 RNAポリメラーゼは、インビトロの転写により、Aリボヌクレオチドに結合した単一の非ウイルス性Gリボヌクレオチド(これが本物のシンドビス5

’末端に対応する) だけを含むように位置している。Apa I 認識配列を含むことは、プラスミドベクター(pKS II<sup>+</sup>、ストラタジェン(Stratagene))ポリリンカー配列へのPCRアンプリコン (amplicon) の挿入を促進する。SP6-5’ シンドビス順方向プライマーおよび全シンドビスゲノムを増幅するために必要な全てのプライマー対の配列を以下に示す。参照配列(ジェンバンク (GenBank) 参照番号SINC G)はStraussら、Virology 133: 92-110による。

プライマー	位置	配列 番号	配列	認識配列 (5'→3')
SP6-1A	Apa I /SP6/+ SIN nts. 1-18	3	TATATGGGCCCCGATTTAGGTGAC ACTATAGATTGACGGCGTAGTAC AC	Apa I
1B	3182-3160	4	CTGGCAACCGGTAAGTACGATAC	Age I
2A	3144-3164	5	ATACTAGCCACGGCCGGTATC	Age I
2B	5905-5885	6	TCCTCTTTTCGACGTGTCGAGC	EcoRI
3A	5844-5864	7	ACCTTGGAGCGCAATGTCCTG	EcoRI
7369R	7349-7328	8	CCTTTTTCAGGGGATCCGCCAC	BamHI
7328F	7328-7349	9	GTGGCGGATCCCCTGAAAAGG	BamHI
3B	9385-9366	10	TGGGCGGTGTGGTCGTCATG	Bcl I
4A	9336-9356	11	TGGGTCTTCAACTCACCGGAC	Bcl I
10394R	10394-10372	12	CAATTCGACGTACGCCTCACTC	BsiWI
10373F	10373-10394	13	GAGTGAGGCGTACGTCGAATTG	BsiWI
4B	Xba I /dT <sub>25</sub> / 11703-11698		TATATTCTAGA(dT) <sub>25</sub> -GAAATG	Xba I

上記6個のプライマーマットによるシンドビスcDNAのPCR増幅は、サーマラーゼ (Thermalase) 熱安定性DNAポリメラーゼ (アムレスコ社 (Amresco Inc.) ソロン (Solon)、オハイオ州) と、供給者から提供される1.5mMのMgCl<sub>2</sub>を含有する緩衝液を使用して、別々の反応で行われる。さらに、この反応は、5% DMSO、およびホット・スタート・ワックス・ビーズ (Hot Start Wax beads) (パーキン・

エルマー (Perkin-Elmer)) を含み、下記のPCR増幅プロトコールを使用する：

温度 (℃)	時間 (分)	周期数
94	2	1
94	0.5	
55	0.5	35
72	3.5	
72	10	10

増幅後、6個の反応生成物をまずpCR IIベクター(インビトロジェン(Invitrogen))に挿入し、次いで前述の適切な酵素を使用して、段階的にpKS II<sup>+</sup> (ストラタジェン(Stratagen)) ベクターのApa I およびXba I 部位の間に挿入する。このクローンを、pVGSP6GENと呼ぶ。

シンドビスゲノムcDNAクローンpVGSP6GENを、25個のヌクレオチド長のポリdA : dTストレッチの下流に隣接した位置でpVGSP6GENを1回切断するXba I による消化により線状にする。線状化pVGSP6GENクローンをジーン・クリーン(Gene Clean) (パイオ101 (BIO 101)、ラ・ホイヤ (La Jolla)、カリホルニア州)で精製し、0.5mg/mlの濃度に調整する。以下の反応条件により、線状化pVGSP6GENクローンの転写をインビトロで40℃で90分間行う：DNA 2 ml / H<sub>2</sub>O 4.25ml / 2.5mMのNTP (UTP, ATP, GTP, CTP) 10ml / 20mMのm<sup>7</sup>G (5') ppp (5') Gキャップ類似体1.25ml / 100mMのDTT 1.25ml / 5 X転写緩衝液 (プロメガ(Promega)) 5 ml / RNasin (プロメガ) 0.5ml / 10mg/mlウシ血清アルブミン0.25ml / SP6 RNAポリメラーゼ (プロメガ) 0.5ml。インビトロ転写反応生成物は、DNaseI (プロメガ) により消化し、逐次希釈フェノール/CHCl<sub>3</sub> およびエーテル抽出により精製し、タメノール沈殿することができ、あるいは、直接トランスフェクションのために使用することができる。インビトロの転写反応生成物または精製したRNAは、市販の陽イオン性脂質化

合物 (リポフェクチン (Lipofectin)、ギブコ-BRL (GIBCO-BRL)、ガイザースバーグ (Gaithersburg)、メリーランド州) と複合体にし、75%のコンフルエン

スで60mMのシャーレに維持されたベビーハムスター腎臓-21 (BHK-21) 細胞に適用する。トランスフェクションされた細胞を30℃でインキュベートする。トランスフェクションの94時間後、広範囲の細胞変性効果 (cytopathologic effects) (CPE) が観察される。シンドビスcDNAクローンから転写されたRNAを受けないプレートでは、明白なCPEは観察されない。さらに、トランスフェクトされた細胞から採取し、BHK-21細胞の新鮮単層に添加され、30℃または37℃でインキュベートされた上澄液 1 ml により、18時間以内に明白なCPEが生じる。これは、シンドビスcDNAクローンpVGSP6GENが真に感染性であることを証明している。

表 1 に示されるpVGSP6GENの配列分析は、本明細書に記載されたシンドビスのゲノムクローンとジェンバンク (Genbank) に含まれるウイルスのクローンの間にある多数の配列の差異を明らかにしている。多くの配列の差異は、シンドビス蛋白における非保存性アミノ酸変化の置換をもたらす。どの配列変化が本明細書に記載されたクローンに独特であるか、あるいはクローニング人工物の結果であるかという問題を解決するために、前述のようにビリオンRNAをRT-PCRにより増幅し、市販のキット (プロメガ (Promega)、マジソン (Madison)、ウィスコンシン州) を使用して、RT-PCRアンプリコン生成物の直接配列決定により、問題のヌクレオチドに関する配列を決定し、そして対応するpVGSP6GEN配列と比較する。この検討の結果を、表 2 に示す。簡単に説明すると、クローニング人工物の結果である 3 個の非保存性アミノ酸変化、Gly→Glu, Asp→Gly、およびTyr→Lysが、各々ウイルスヌクレオチド2245, 6193、および6730で観察される。これらの非保存性アミノ酸変化を生じさせるヌクレオ

チド変化は、全てウイルスの非構造蛋白 (NSP) 遺伝子に (ヌクレオチド2245はNSP 2に、ヌクレオチド6193および6730はNSP4に) 位置づけられる。

NSP2およびNSP4遺伝子の修復は、前述のように 5 回ブランク精製したストックからのビリオンRNAを使用したRT-PCRにより達成される。前述のSP6-1A/1Bプライマー対は、ヌクレオチド2245変化を修復するために使用される。RT-PCRアンプリコン生成物を、Eco47 IIIIおよびBgl IIで消化し、882塩基対断片を 1 % アガロース/TBEゲル電気泳動により精製し、Eco47 IIIIおよびBgl IIでの消化およびCIAP

での処理により調製されたpVGSP6GENの対応する領域中に交換する。前記3A/7349 Rプライマー対は、ヌクレオチド6193およびヌクレオチド6730変化を修復するために使用される。RT-PCRアンプリコン生成物を、EcoR I およびHpa I で消化し、1,050塩基対断片を1%アガロース/TBEゲル電気泳動により精製し、pVGSP6GENの対応する領域中に交換する。このクローンはpVGSP6GENrepと呼ぶ。Xba I での消化により線状にされたpVGSP6GENrepのDNAから、インビトロ転写されたRNAによるBHK細胞のトランスフェクションは、前述のようにトランスフェクションの18時間後に広範囲のCPEをもたらす。



表 1

ヴァイアジェン (Viagene) とジェンバンク (GenBank) の配列の間の  
シンドビスのゲノムクローンの差異

SIN nt. 番号	変化	コドン変化	コドン上の 位 置	アミノ酸 変 化
<u>非コード領域:</u>				
45	T->C	N.A.	N.A.	N.A.
<u>非構造蛋白:</u>				
353	C->T	UAU->UAC	3'	Tyr->Tyr
1095	A->C	AUA->CUA	1'	Ile->Leu
1412	T->C	UUU->UUC	3'	Phe->Phe
2032	A->G	GAG->GGG	2'	Glu->Gly
2245	G->A	GGG->GAG	2'	Gly->Glu
2258	A->C	UCA->UCC	3'	Ser->Ser
2873	A->G	CAA->CAG	3'	Gln->Gln
2992	C->T	CCC->CUC	2'	Pro->Leu
3544	T->C	GUC->GCC	2	Val->Ala
3579	A->G	AAA->GAA	1'	Lys->Glu
3822	A->G	ACC->GCC	1'	Thr->Ala
3851	T->C	CUU->CUC	3'	Leu->Leu
5351	A->T	CAA->CAU	3'	Gln->His
5466	G->A	GGU->AGU	1'	Gly->Ser
5495	T->C	AUU->AUC	3'	Ile->Ile
5543	A->T	ACA->ACU	3'	Thr->Thr
5614	T->C	GUA->GCA	2'	Val->Ala
6193	A->G	GAC->GGC	2'	Asp->Gly
6564	G->A	GCA->ACA	1'	Ala->Thr
6730	A->G	UAC->UGG	2'	Tyr->Cys

構造蛋白：

8367	A->G	AUU->GUU	1'	Ile->Val
8698	T->A	GUA->GAA	2'	Val->Glu
9108	AAG del	AAG->del	1'-3'	Glu->del
9144	A->G	AGA->GGA	1'	Arg->Gly
9420	A->G	AGU->GGU	1'	Ser->Gly
9983	T->G	GCU->GCG	3'	Ala->Ala
10469	T->A	AUU->AUA	3'	Ile->Ile
10664	T->C	UUU->UUC	3'	Phe->Phe
10773	T->G	UCA->GCA	1'	Ser->Ala

表 2

## シンドビスのゲノムクローン人工物の解析

SIN nt. 番号	アミノ酸 変化	ヴァイアジェン ユニーク	クローニング 人工物
<u>非構造蛋白:</u>			
2032	Glu->Gly	+	*
2245	Gly->Glu		+
2258	Ser->Ser	+	*
2873	Gln->Gln	+	
2992	Pro->Leu	+	
3544	Val->Ala		+
3579	Lys->Glu	+	
3822	Thr->Ala		+
3851	Leu->Leu		+
5351	Gln->His	+	
5466	Gly->Ser		+
5495	Ile->Ile		+
5543	Thr->Thr		+
6193	Asp->Gly		+
6730	Tyr->Cys		+
<u>構造蛋白:</u>			
8637	Ile->Val	+	
8698	Val->Glu	+	
9108	Glu->del	+	
9144	Arg->Gly	+	

\* 混合物: シンドビスのジェンバンクとヴァイアジェンの両方の株がこのヌクレオチドで存在する。

## 実施例 2

## シンドビス感染を開始するプラスミドDNAベクターの生成

全長ゲノムシンドビスcDNAクローンの大きさのため、全長分子のインビトロ転

写はやや効率が悪い。これは、プラーク形成により測定すると、ウイルスの感染中心に関して、インビトロ転写したRNAのトランスフェクトした量に比例して、低いトランスフェクション効率をもたらす。この概念はまた、シンドビス発現ベクターのインビトロ転写にも該当する。cDNAが次にインビボのウイルスRNAの合成に向けられるDNA分子として感受性細胞中にトランスフェクトされれば、感染周期を開始する能力または異種配列の発現を指令する能力についての候補cDNAクローンおよび他のシンドビスcDNA発現ベクターの試験は、大きく促進されるであろう。100%近い高トランスフェクション効率が、種々の市販の合成脂質調製物と複合体化したDNAで、またはエレクトロポレーションによりトランスフェクトされた細胞で報告された。また、ピコルナウイルス (picornaviruses) からのcDNAは、感受性細胞中にトランスフェクトされると、感染周期を開始することができることが証明されている (van der Werfら、PNAS 83: 2330-2334, 1986)。しかし、ゲノムシンドビスcDNAが哺乳動物のプロモーターに近接して置かれ、細胞中にトランスフェクトされた時に、野生型ウイルスに特徴的な感染周期を開始することのできるRNAが得られるかどうかは、文献には記載されていない。

適切なシグナルを有するDNA分子は、直接動物中に導入されると、インビボで複製できることは公知である (Dubenskyら、PNAS 81: 7429-7533, 1984)。シンドビスcDNAベクターのDNA分子としての直接の投与は、シンドビスが指令する緩和剤の発現がトランスの効果を有する幾つかの適用には可能である。これらの適用は、免疫調

節およびサイトカインまたは他の治療用蛋白の発現を含む。シンドビスの範囲で、シンドビスcDNA発現ベクターの直接投与は、シンドビス粒子の作成よりもより単純であるという利点を提供する。

異種の治療用緩和剤配列を含有するシンドビスcDNAベクター作成体を、真核RNAポリメラーゼII発現カセットに挿入する。この作成体は、真核細胞重層ベクターイニシエーション系 (Eukaryotic Layered Vector Initiation System) (ELVIS) として公知であり、順に下記の成分より成る：本物のシンドビス5'末端でウイルスRNAの合成を開始することができる5'真核細胞プロモーター、シンドビス

の非構造蛋白をコードするヌクレオチド配列、ウイルスの結合領域、異種配列、シンドビスRNAポリメラーゼ認識配列、転写終了配列および3' ポリアデニル化シグナル。本明細書に記載された真核細胞シンドビスcDNA発現ベクターは、例えばシンドビスと異種遺伝子領域の間に位置する適切なスプライシングシグナルをも含んでよい。

野生型ウイルスに特徴的な感染周期を開始する、シンドビスcDNAクローンpVGS P6GENrepの能力を、哺乳動物RNAポリメラーゼII発現カセットにゲノムウイルスcDNAを配置することにより最初に測定する。これは、以下に詳細に記載したように作成される。このクローンpVGS P6GENrepを、Bgl IIおよびXba Iで消化し、反応生成物を0.8%アガロース/TBEで電気泳動し、生じた9,438塩基対断片を摘出し、ジーン・クリーン(Gene Clean)(バイオ101 (BIO 101)、ビスタ(Vista)、カリフォルニア州)で精製し、pcDNA3 (インビトロジェン (Invitrogen)、サンジエゴ、カリフォルニア州)のBgl II、Xba I、およびCIAPにより処理から生じる4,475塩基対ベクター断片に結合させる。

モロニー(Moloney)ネズミ白血病ウイルス(Mo-MLV)からのロン

グ・ターミナル・リピート(LTR)を、最初の転写ヌクレオチドが単一G残基であり、これがインビボでキャップされ、シンドビス5'末端が続くように、5'ウイルス末端に位置させる。3個の非ウイルス性ヌクレオチドを5'末端に含有するインビトロ転写RNAが感染性であることは公知である(Riceら、J. Virol. 61: 3809-3819, 1987)。Mo-MLV LTRとシンドビス5'末端の並列化が、以下に詳細に記載したように重複PCRにより行われる。BAGベクター(Priceら、PNAS 84: 156-160, 1987)と下記のプライマー対を含有する反応物中で、最初のプライマリーPCR反応でMo-MLV LTRが増幅される)：

順方向プライマー：BAGBg12F1(緩衝配列/Bgl II認識配列/Mo-MLV LTRヌクレオチド1～22)：

5' -TATATAGATCTAATGAAAGACCCACCTGTAGG

逆方向プライマー：BAGwt441R2 (SINヌクレオチド5～1/Mo-MLV LTRヌクレオチド441～406)：

5' -TCAATCCCCGAGTGAGGGGTTGTGGGCTCTTTTATTGAGC

上記のプライマー対によるMo-MLV LTRのPCR増幅が、サーマラーゼ (Thermax) 熱安定性DNAポリメラーゼ (アムレスコ社 (Amresco Inc.)、ソロン(Solon)、オハイオ州) と、供給者から提供される1.5mMのMgCl<sub>2</sub>を含有する緩衝液を使用して行われる。さらに、この反応は、5%DMSO、およびホット・スタート・ワックス・ビーズ (Hot Start Wax beads) (パーキン・エルマー(Perkin-Elmer))を含み、下記のPCR増幅プロトコールを使用する:

温度 (°C)	時間 (分)	周期数
94	2	1
94	0.5	
55	0.5	35
72	0.5	
72	10	1

第2のプライマリーPCR反応中のシンジビス5'末端の増幅が、pVGSP6GENrep クローンと下記のプライマー対を含有する反応で達成される:

順方向プライマー: (Mo-MLV LTRヌクレオチド421~441/SINヌクレオチド1~16)

5' -CCACAACCCCTCACTCGGGGATTGACGGCGTAGTAC

逆方向プライマー: (SINヌクレオチド3182~3160)

5' -CTGGCAACCGGTAAGTACGATAC

Mo-MLV LTRのPCR増幅は、このプライマー対と上記増幅反応条件で、下記のPCR増幅プロトコールを使用して行われる:

温度 (°C)	時間 (分)	周期数
94	2	1
94	0.5	
55	0.5	35
72	3.0	
72	10	1

プライマリーPCR反応からの457塩基対および3202塩基対生成物を、ジーン・クリーン (Gene Clean) で精製し、下記のプライマー対と一緒にPCR反応で使われる:

順方向プライマー: BAGBg12F1 (緩衝配列/Bgl II認識配列/Mo-MLV LTRヌクレオチド1~22):

5' -TATATAGATCTAATGAAAGACCCACCTGTAGG

逆方向プライマー: (SINヌクレオチド2300~2278):

5' -GGTAACAAGATCTCGTGCCGTG

プライマーPCRアンプリコン生成物のPCR増幅は、このプライマー対と上記増幅反応条件で、下記のPCR増幅プロトコールを使用して行われる:

温度 (°C)	時間 (分)	周期数
94	2	1
94	0.5	
55	0.5	35
72	3.0	
72	10	1

最初のプライマリーPCRアンプリコン生成物の25個の3'末端塩基は、第2のプライマーPCRアンプリコン生成物の25個の5'末端塩基と重複する; 生じた2,752塩基対の重複第2PCRアンプリコン生成物を、0.8%アガロース/TBE電気泳動により精製し、Bgl IIで消化し、そして2,734塩基対の生成物をBgl IIおよびCIA Pで処理したpcDNASINbgl/Xba中に結合する。生じた作成体は、16,656塩基対であり、pVGELVISと呼ぶ。pVGELVISの配列は、図3に示す。シンドビスヌクレオチドは、配列の塩基1~11,700に含まれる。

pVGELVISプラスミドDNAは、リポフェクタミン (Lipofectamine) (ギブコーBRL (GIBCO-BRL)、ガイザースバーグ (Gaithersburg)、メリーランド州) と供給者により示唆される条件により複合体化し (約5  $\mu$ g DNA/8mg脂質試薬)、約75%コンフルエンスでBHK-21細胞を含有する35mmウェルに添加する。野生型シンドビスウイルス感染に特徴的な細胞変性効果 (CPE) が、感染の48時間後に観察さ

れる。新鮮BHK-21単層へのトランスフェクト上澄液1mlの添加によ

り、16時間以内にCPEが起こる。このデータは、pBGELVIS作成体中でウイルスcDNAとRNAポリメラーゼII発現カセットシグナルが正しく並列されたことを示しており、これによりDNA発現モジュールからRNAウイルスの開始が新たにもたらされる。この革新的技術は、一般的なシンドピス系の有用性を増強するのみでなく、物理的遺伝子転移ベクター(Physical Gene Transfer vector)の別の方法を提供するものである。

pVGELVISからのゲノム長RNAの最初の転写に続くベクター複製の効率もまた、40倍より本物の3'末端をもたらし修飾により増強される。この目的のために、ELVISベクター作成体に2つの異なる修飾を行う。最初の修飾はシンドピスポリアデニル酸領域に隣接させた、肝炎デルタウイルス(HDV)のアンチゲノムリボザイム配列を利用する。第2の修飾は、シンドピスポリアデニル酸領域と下流のベクター配列の欠失であり、これによりシンドピスヌクレオチド11,700の、ウシ成長ホルモン遺伝子転写停止/ポリアデニル化配列への融合がもたらされる。

HDVリボザイム含有作成体は、PCR法と、全84ヌクレオチドのアンチゲノムリボザイム配列(Perotta and Been, Nature 350:434-6, 1991)を含有する重複オリゴヌクレオチドプライマーを使用して作成される。HDV配列に加えて、2つのプライマーが、ELVISベクターへの挿入を目的として隣接する制限酵素部位を含有する。2回転のPCRを行う：最初はオリゴヌクレオチドプライマーHDV49-XCとHDV17~68(下記)を使用し、

HDV17~68:

5'-TCCACCTCCTCGCGGTCCGACCTGGGCATCCGAAGGAGG-

ACGCACGTCCACT-3' (配列番号\_\_)

HDV49-XC:

5'-ACTTATCGATGGTTCTAGACTCCCTTAGCCATCCGAGTGGA-

CGTGCGTCCTCCTTC-3' (配列番号\_\_)

続いて最初のPCR反応物を希釈し、これを次にプライマーHDV49-XC(最初の反応



から)とHDVX-36(下記)を用いるPCRの第2の周期で鋳型として使用する。

HDVX-36:

5'-ACGTCTAGATCTGGGTCGGCATGGCATCTCCACCTCCTCGCGGTCCGA-3'

(配列番号 )

合成後、HDVリボザイム断片を、隣接する配列(下線)を切断するXba Iで消化し、その2つの部位の一方のみを切断するためにXba Iで部分的に消化されたELVISベクターDNA中に結合する。制限部位と配列分析により、正しい部位と正しい配向での挿入についてスクリーニングを行う。この作成体は、pVGEGVISHDVと呼ぶ。

第2の方法では、pVGEGVIS中のシンドビスポリアデニル酸領域と下流のベクター配列の欠失による、ウシ成長ホルモン遺伝子転写停止/ポリアデニル化配列へのシンドビスヌクレオチド11,700の融合が、重複PCRにより行われる。最初のプライマーPCR反応でのシンドビス3'末端の増幅が、pVGEGVISと下記のプライマー対を含有する反応で行われる:

順方向プライマー: SIN10349F (SINヌクレオチド10394~10372)

5'-GACAGTGAGAACAGCCAGATGAG

(配列番号 )

逆方向プライマー: SINBGH11700R (BGHヌクレオチド13~1/SINヌクレオチド11700~11675)

5'-CAGCGAGCTCTAGGAAATGTTAAAAACAAAATTTTGTG

(配列番号 )

上記プライマー対とのpVGEGVISのPCR増幅は、サーマラーゼ(Th

ermalase)熱安定性DNAポリメラーゼ(アムレスコ社(Amresco Inc.)、ソロン(Solon)、オハイオ州)と、供給者から提供される1.5mMのMgCl<sub>2</sub>を含有する緩衝液を使用して行われる。さらに、この反応は、5% DMSO、およびホット・スタート・ワックス・ビーズ(Hot Start Wax beads)(パーキン・エルマー(Perkin-Elmer))を含み、下記のPCR増幅プロトコルを使用する:

温度 (°C)	時間 (分)	周期数
94	2	1
94	0.5	
55	0.5	35
72	1.5	
72	10	1

第2のプライマリーPCR反応でのBGH遺伝子転写停止／ポリアデニル化配列の増幅は、pVGELVISクローンと下記のプライマー対を含有する反応で行われる：

順方向プライマー：pCSIN1018F (SINヌクレオチド11,687～11,700／PCDNA3ヌクレオチド1018～1039)：

5'-CCACAACCCCTCACTCGGGGATTGACGGCGTAGTAC

(配列番号 2)

逆方向プライマー：pCDNA1633R (pCDNA3ヌクレオチド1633～1608)：

5'-GTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCAC

(配列番号 3)

BGII遺伝子の5'末端のPCR増幅は、このプライマー対と上記増幅反応条件で、下記のPCR増幅プロトコールを使用して行われる：

温度 (°C)	時間 (分)	周期数
94	2	1
94	0.5	
55	0.5	35
72	1.0	
72	10	1

プライマリーPCR反応からの1,364塩基対および629塩基対の生成物を、ジーン・クリーン (Gene Clean) で精製し、PCR反応で下記のプライマー対と一緒に使用する：

順方向プライマー：SIND310374F (5ヌクレオチド緩衝／Hind III認識部位／SINヌクレオチド10374～10394)：

5'-TATATAAGCTTGAAGCGTACGTGAATTGTCAG

(配列番号\_\_)

逆方向プライマー：pCDNA1575R (pCDNA3ヌクレオチド1575～1552)

5'-GAAAAACCGTCTATCAGGGCGATG

(配列番号\_\_)

プライマーPCRアンプリコン生成物のPCR増幅は、このプライマー対と上記増幅反応条件で、下記のPCR増幅プロトコールを使用して行われる：

温度 (℃)	時間 (分)	周期数
94	2	1
94	0.5	
55	0.5	35
72	2.0	
72	10	1

最初のプライマリーPCRアンプリコン生成物の27個の3'末端塩

基は、第2のプライマリーPCRアンプリコン生成物の27個の5'末端塩基と重複する；生じた1,976塩基対の重複第2 PCRアンプリコン生成物を、0.8%アガロース/TBE電気泳動により精製し、Hind IIIとDra IIIで消化し、そして1,941塩基対の生成物をHind IIIとDra IIIで消化しCIAPで処理したpcDNA3中に結合する。この作成体は、pCDNAELVIS 3' と呼ぶ。pCDNAELVIS 3' 作成体をBsiW IとPvu I消化し、生じた5197塩基対断片を0.8%アガロース/TBE電気泳動により精製し、BsiW IとPvu IでのpVGELVISの消化しCIAPで処理して単離した11,398塩基対断片に結合し、続いて0.8%アガロース/TBE電気泳動およびジーン・クリーン (Gene Clean) 処理を行う。生じた作成体は、16,595塩基対であり、pVGELVISd1 3' と呼ぶ。

pVGELVISHDVおよびpVGELVISd1 3' プラスミドの野生型シンドビスウイルスに特徴的な感染を開始する能力を試験するために、DNAクローンをリポフェクタミン (Lipofectamine) (ギブコー-BRL (GIBCO-BRL)、ガイザースバーグ (Gaithersburg)、メリーランド州と供給者により示唆される条件により複合体化し (約

5  $\mu$ g DNA/8mg脂質試薬)、約75%コンフルエンスでBHK-21細胞を含有する35 mmウェルに添加する。この方法によりCPEが観察されれば、新鮮BHK-21単層を感染させるためにトランスフェクション上澄液1 mlを使用するか、あるいは上澄液中のシンドビスウイルスのレベルをプラーク測定により直接定量することができる。

他の応用では、インビボの転写開始が本物の5'末端ウイルスヌクレオチドに対応するように、pCDNA3プラスミド中に含まれるCMVプロモーターをシンドビスゲノムcDNAの隣に位置させることが望ましい。プラスミドpCDNA3上のCMVプロモーターの出発部位は、インビトロで転写開始点をマッピングすることにより測定される。これは、最初にpCDNA3プラスミドをDra III制限エンドヌクレアーゼ (

ニュー・イングランド・バイオラプス社 (New England Biolabs Inc.)、ビバリー (Beverly)、マサチューセッツ州)で製造者の指示により消化することにより行われる。Dra IIIは、このプラスミドをヌクレアーゼ1546で1度切断し、線状の5'446塩基対DNA分子が生じる。このDNAをジーンクリーンIIキット (GeneClean II kit) (バイオ101 (BIO 101)、サンジエゴ、カリフォルニア州)を使用して説明書に従い正確に精製する。線状化されたpCDNA3は、HeLa核抽出物インビトロ転写系 (HeLa Nuclear Extract in vitro Transcription System) (プロメガ (Promega)、マジソン (Madison)、ウィスコンシン州)により、3  $\mu$ gの線状化pCDNA3、400  $\mu$ Mの各リボヌクレオチド、3 mMのMgCl<sub>2</sub>、および8単位のHeLa細胞核抽出物を含有する反応で転写される。この25  $\mu$ lの反応物を35℃で1時間インキュベートする。1単位のRQ1 DNAase (プロメガ (Promega)、マジソン (Madison)、ウィスコンシン州) および40単位のRNasin (プロメガ (Promega)、マジソン (Madison)、ウィスコンシン州)を反応物に添加し、37℃で30分間インキュベートしてDNAの鋳型を除去する。この反応は、ストップ・ミックス (Stop Mix) (HeLa抽出物と一緒に供給される) 175  $\mu$ lの添加により終了する。反応物は、同容量のフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール (25:24:1)で抽出し、続いてクロロホルム:アミルアルコール (24:1)で抽出する。反応物を500  $\mu$ lの無水

エタノールで沈殿させる。このRNAを12,000×Gで15分間遠心分離してペレット化する。このペレットを80%エタノールで濯ぎ、20  $\mu$  lの水に再懸濁する。

SP6プロモーターに相補的なプライマー (ATTTAGGTGACACTATAG, BRL社(BRL Corp.)), ベセスダ (Bethesda)、メリーランド州) は、10pmolのプライマーを2倍過剰のガンマ<sup>32</sup>P ATP (ICN社(ICN Corp.)), アーバイン (Irvine)、カリフォルニア州)、10単位のT4ポ

リヌクレオチドキナーゼ (プロメガ(Promega)、マジソン(Madison)、ウィスコンシン州) およびIXキナーゼ緩衝液 (T4キナーゼと共に供給される) と混合することにより、5'末端を<sup>32</sup>Pで標識する。反応物を37℃で30分間、次に95℃で5分間インキュベートする。

インビトロで転写したRNA 10  $\mu$  lを1.5pmolのプライマーと混合することにより、RNAを標識したプライマーにアニーリングする。この混合物を90℃に加熱して、徐々に冷却する。この混合物を、50mMのトリス-HCl pH8.3, 10mMのMgCl<sub>2</sub>, 50mMのNaCl, 1mMのDTT, 10  $\mu$  Mの各dNTP、および15単位のAMVリバーーストランスクリプターゼ (AMV Reverse Transcriptase) (USB社(UAB Corp.)), クリーブランド、オハイオ州) の中に入れる。この反応混合物を42℃で30分間インキュベートする。反応は、1/3容量の95%ホルムアミド、20mMのEDTA, 0.05%プロモフェノール・ブルー、および0.05%のキシレン・シアノール・FF (Xylene Cyanol FF) の添加により終了する。

pcDNA3プラスミドは、上記と同一の<sup>32</sup>P標識プライマーを使用して、fmolDNA配列決定系 (fmol DNA Sequencing System) (プロメガ(Promega)、マジソン(Madison)、ウィスコンシン州) を正確に指示書の通りに使用することにより配列決定される。配列決定反応物は、プライマーを伸長したインビトロRNA反応物 2  $\mu$  lに隣接した6%変性ゲル上で展開される。このゲルを1600Vで1時間電気泳動し、乾燥し、そしてフィルムに一晩暴露させる。転写開始部位を決定するため、全長cDNAバンドをpcDNA3配列のレーンと比較する。この方法を使用して、CMVプロモーターの転写開始部位は、CMVプロモーターのちょうど39塩基下流であるヌクレオチド番号858のG残基にあると決定される (インビトロジェンのpcDNA3ベ

クターの番号づけによる)。

次にpVGELVISの作成のための上記方法を使用して、pcDNA3プラスミドからのCMVプロモーターを、重複PCRによりシンドビスcDNAに並列にする。上記方法により、任意のRNAポリメラーゼIIプロモーターの正確な転写開始点を決定することができ、ELVIS配置のプロモーターの適切な並列配置が可能になる。ELVIS配置の誘導可能なプロモーターの使用により、トランスフェクションされた細胞株の感染の開始を制御することが可能になる。

### 実施例 3

#### RNAおよびプラスミドDNAシンドビスベクターの調製

##### A. シンドビスベシクベクターの作成

塩基性シンドビスベクターの作成の最初の工程は、ウイルス5' および3' 末端からの別々の成分を含有する2つのプラスミドサブクローン(これらは次に塩基性遺伝子転移ベクターを組み立てるために使用される)の生成である。最初のプラスミドサブクローンは、ウイルスの3' 末端に40個の末端ヌクレオチドを含有し、dA:dTヌクレオチドの25塩基ストレッチを含有する。ベクターの3' 末端は、下記のプライマーの配列を有するように化学合成される。

順方向プライマー: SIN11664F(緩衝配列/Not I 部位/SINヌクレオチド11664~11698):

5'-TATATGCGGCCGCTTTCTTTTATTAATCAACAAAATTTTGTTTTTAA

(配列番号\_\_)

逆方向プライマー: SINXba 11700R(緩衝配列/Sac I 部位dT25/SINヌクレオチド11700~11692):

5'-TATATGAGCTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAATGTTAAAA

(配列番号\_\_)

上記オリゴヌクレオチドは、10mMのMgCl<sub>2</sub>の存在下で等モル濃度で混合され、100℃に5分間加熱されて、徐々に室温に冷却される

。次にこの部分的に2本鎖の分子をクレノー (Klenow) DNAポリメラーゼと50μ

MのdNTPを使用して完全にする。次にこの89塩基対分子をNot I とSac I で消化し、2%ヌシーブ(NuSieve)/1%アガロースゲルで精製し、pKS II+プラスミド(Not I とSac I で消化し、そして10:1モル過剰の挿入:ベクター比のCIAPで処理された)中に結合する。この作成体は、pKS II 3' SINと呼ぶ。

第2のプラスミドサブクローンは、シンドピスの5'末端RNAポリメラーゼプロモーターを含む5'の7,643塩基対を含有する。このクローンの3'末端は、下記の配列を有する逆方向のプライマーによるPCR増幅により誘導される。

逆方向プライマー: SINXho7643R(緩衝配列/Xho I 部位/SINヌクレオチド7643~7621):

5'-TATATCTCGAGGGTGGTGTGTAGTATTAGTCAG

(配列番号\_\_)

この逆方向プライマーは、ウイルスヌクレオチド7643~7621にマップされ、結合コア成分の3'末端から41塩基対下流にある。さらに、ウイルスヌクレオチド7643は、構造蛋白翻訳開始点から4ヌクレオチド上流にある。Xho I 認識配列よりなる6個のヌクレオチドが後に続く。このプライマーの最初の5個の5'ヌクレオチドは、PCRアンプリコン生成物の十分な消化のための「緩衝配列」として作用するために含まれる。

この反応で順方向プライマーは、プライマー2A(実施例1に記載)であり下記の配列を有する:

ATACTAGCCACGGCCGGTATC (配列番号\_\_)

上記プライマーをpVGSP6GENrepプラスミドと共に使用するPCR実験から生じた4510塩基対アンプリコン生成物は、酵素Sfi I およびXho I で消化される。生じた2526塩基対断片は、ゲル精製される。

このシンドピスcDNAクローンpVGSP6GENrepは、Apa I およびSfi I で消化される。5144塩基対断片は、ゲル精製されて2526塩基対のSfi I /Xho I 断片、およびApa I とXho I で消化してCIAPで処理したpKS II+プラスミドと一緒に結合される。pKS II+プラスミドに含有される5'末端にRNAポリメラーゼプロモーターを含むシンドピスヌクレオチド1~7643を有するクローンが単離される。この作成体は、

pKS II 5' SINと呼ぶ。

完全に塩基性のベクターの組み立ては、pKS 5' SINをXho I とSac I で消化し、CIAPで処理し、そして大きな10,533塩基対断片をゲル精製することにより達成される。このpKS 5' SINの10,533塩基対断片は、pKS II 3' SINのXho I とSac I での消化から生じる168塩基対の小さい断片と一緒に結合される。この作成体は、pKSSINBVと呼び、概略を図4に示す。

シンドビスベクタークロンのインビトロ転写から生じるRNAでトランスフェクトされた細胞中の異種遺伝子の発現を証明するために、ホタルのルシフェラーゼレポーター遺伝子をシンドビスベシックベクターに挿入する。この実験は、シンドビスベクターの全機能を証明する。

#### B. シンドビスルシフェラーゼベクターの作成

シンドビスルシフェラーゼベクターの作成は、3つの独立のプラスミド： pKS II 5' SIN, pKS II 3' SIN、およびpGL2-塩基性ベクターの成分を一緒に組み立てることにより行われる。pGL2-ベクタープラスミド（プロメガ(Promega)、マジソン(Madison)、ウィスコンシン州)は、ホタルルシフェラーゼ全遺伝子含有する。このルシフェラーゼ遺伝子を、まずpKS II 3' SINプラスミド中に挿入する。これは、pGL2-塩基性ベクターをBamH I とHind IIIで消化して生じる断片を含有する2689塩基対のルシフェラーゼのゲル精製、

およびpKS II 3' SINをBamH I とHind IIIでの消化しCIAPで処理して生じる3008塩基対の大きなゲル精製された断片との結合により行われる。この作成体は、pKS II 3' SIN-lucと呼ぶ。

シンドビスルシフェラーゼベクターの最終組み立ては、pKS II 5' SINをXho I とSac I で消化し、CIAPで処理し、そして大きな10,533塩基対断片をゲル精製することにより行われる。このpKS II 5' SINの10,533塩基対断片は、pKS II 3' SIN-lucのXho I とSac I を用いる消化により生じる2854塩基対の小さい断片と一緒に結合される。この作成体は、全シンドビス非構造遺伝子コーディング領域とゲノム複製に必要な3' ウイルス成分を含有する。このホタルルシフェラーゼ遺伝子を、これら2つのウイルス5' および3' 成分の間に配置する。このベクター



は、pKSSINBV-lucとして公知であり、概略は図4に示される。このFfi I および Sac I 間のSIN-BV作成体は、pGVELVISのFfi I およびSac I 部位間に交換される。異種遺伝子の発現は、BHK細胞へのトランスフェクション後に観察される。

#### C. トランスフェクションされ感染されたBHK細胞中のルシフェラーゼの発現

シンドビスベシクベクターの機能を試験するために、実施例1に記載したように、Sac I で消化して線状化した、pKSSINBV-lucから、インビトロで転写したRNAでトランスフェクションした細胞中のルシフェラーゼの発現を行った。さらに、BspE I を用いてpVGSP6GENrepを消化して、非構造遺伝子領域の大部分が欠如した相補的パッケージングベクターを作成し、希釈条件下で結合させた。この作成体はpVGSP6GENd1Bspとして知られ、塩基422~7,054の間の非構造遺伝子配列が欠如している。このクローンは8,008塩基対であり、その概略を図5に示す。pVGSP6GENd1Bspのインビトロの転写は

実施例1に示した通りであり、Xba I により線状化する。トランスフェクションした細胞株のルシフェラーゼの発現は、トランスフェクション後24時間目に行う。転写生成物をインビトロでリポフェクチン (Gibco-BRL, Gaithersburg, メリーランド州) と複合体を形成させて、トランスフェクションと同時トランスフェクションを行う。さらに1mlの上澄液を用いてBHK細胞のコンフルエントな単層を感染させ、感染後24時間目にルシフェラーゼの発現を試験する。この実験の結果を図6に示す。結果は、BHK細胞のトランスフェクション後に多量のレポーター遺伝子が発現され、インビトロで転写したpVGSP6GENd1Bspで細胞を同時トランスフェクションすると発現活性が移行 (例えば、パッケージング) することを明瞭に示す。

#### D. 変化した結合領域SINDBISベクターの作成

1. 結合領域を不活性化するために、NSP4カルボキシ末端と結合領域の重複部分内のヌクレオチドを変化させ、Sindbisに対応するベクターヌクレオチドをサブゲノム開始点の前でSindbisヌクレオチド7598で停止させる。この作成の概略を図7に示す。

簡単に説明すると、以下の配列を有する逆プライマーを用いて非緊縮反応サイ

クル条件下でpKSSINBVクローンから断片をPCR増幅する：

TATATGGGCCCTTAAGACCATCGGAGCGATGCTTTATTTCCCC

(配列番号\_\_)

逆方向プライマー中の下線を引いた塩基は、コードされたアミノ酸に影響しない結合領域のヌクレオチド変化に対応する(下記)。すべてのヌクレオチド変化はトランスポージョン(塩基変換)である。

NSP4の3'末端(ウイルスヌクレオチド7580~7597)：

TCT CTA CGG TGG TCC TAA (配列番号\_\_)

ser leu arg trp ser stop (配列番号\_\_)

G C A T

(逆方向プライマーからヌクレオチド変化が生じる)

逆方向プライマーは、シンドビスヌクレオチド7597~7566に相補的であり(ただし、結合領域が変化した領域は除く)、効率的な酵素消化のための5'末端TATA Tテール「緩衝配列」の後に、5'末端に6個のヌクレオチドのApa I 認識部位を有する。

この反応の順方向プライマーは、下記の配列を有するプライマー2Aである(実施例1に記載)：

ATACTAGCCACGGCCGGTATC (配列番号\_\_)

前述のプライマーを用いるpKSSINBVによるPCR反応から得られる4,464塩基対アンプリコンをSfi IとApa Iで消化し、ゲル精製された2,480塩基対断片を、pKS I I+Apa Iの消化とCIAPによる処理により得られるゲル精製した5,142塩基対断片と結合する。前述の結合領域に変化を有しシンドビスヌクレオチド1に細菌性T7プロモーターを含むシンドビスヌクレオチド1~7597よりなる作成体を、pKS 5' SIND1JRと呼ぶ。

不活性化した結合領域ベクターの最終的作成は、pKS 5' SIND1JRをApa Iで消化して得られる7,622塩基対の大きなシンドビス断片を、pKS II 3' SINのApa Iによる消化とCIAPによる処理により得られる3,38塩基対断片と結合することにより行われる。3' シンドビス成分と比較して5' シンドビス成分の陽性の配向は、制限エンドヌクレアーゼ分析により確認される。

サブゲノムmRNAの開始と合成は、pKSSINBVd1JRベクターからは起きない。この仮説を検証するためにpKSSINBVとpKSSINBVd1JRのRNase保護aseを行う。ウイルスヌクレオチド7,598にウイルスサブゲノムRNA開始点を有する、一部が結合領域に相補的な<sup>32</sup>P標識RNA

プローブを用いて、pKSSINBVとpKSSINBVd1JRベクターでBHK-21細胞をトランスフェクションして得られるウイルスRNAとハイブリダイゼーションさせる。RNase保護測定法は、pKSSINBVでトランスフェクションした細胞は2つの断片（ゲノム性のサブゲノム性）を有し、pKSSINBVd1JRでトランスフェクションした細胞はゲノム特異性の1つの断片のみを有することを示す。これらの結果は、pKSSINBVd1JR中の結合領域が確かに不活性化されていることを証明する。

2. サブゲノムRNAメッセージに対応する領域からのゲノムRNAの翻訳を試験するために、上記pKSSINBVd1JRベクターの不活性化した結合領域にルシフェラーゼレポーター遺伝子を挿入する。これはpKSSINBVd1JRプラスミドをXho IとSac Iで消化しCIAPで処理をして、得られる10,197塩基対断片をゲル精製することにより作成される。pKSSINBVd1JR断片を、pKS II 3' SIN-lucをXho IとSac Iで処理して得られる2854断片と結合させる。この作成体は、不活性化した結合領域中でシンドビスヌクレオチド7597で停止する領域をコードする全シンドビス非構造遺伝子と、ゲノム複製に必要な3' ウイルス成分を含有する。ホタルのルシフェラーゼ遺伝子はこれらの2つの5' と3' 成分の間に入れる。このベクターをpKSSINBVd1JR-lucと呼ぶ。

pKSSINBVd1JR-lucベクターからのレポーター遺伝子の発現を、トランスフェクションしたBHK-21細胞中で試験する。機能性節蛋白の翻訳を、検出にルミノメーターを用いてルシフェリン発光測定法により測定する。この測定法の感度は $1 \times 10^{-20}$ モル（ルシフェラーゼ）である。ルシフェラーゼの分子領域は62,000ダルトンであるため、この検出限界は6,020分子である。すなわち典型的な実験においても、もし60mMシャーレ中の $1 \times 10^6$ 細胞の0.6%がpKSSINBVd1JR-lucベクターでトランスフェクションされ、かつもしこれら

のトランスフェクションされた細胞がただ1つのルシフェラーゼの機能性分子を発現するなら、本測定法によりこの酵素活性を測定される。この実験ではpKSSINBVdIJR-lucベクターの結合領域領域が不活性化されていることを証明することが重要である。これはRNase保護測定法により行われ、前述のプライマーを用いて、pKSSINBVdIJR-lucとpKSSINBV-lucベクターでトランスフェクションした細胞中で合成したウイルスRNAを比較する。

3. すでに定義されているように (Levisら、J. Virol.: 64 : 1726-1733, 1990) シンドビスヌクレオチド7579-7602よりなる、最小-19>+5結合領域各オリゴヌクレオチド対を、インビトロで合成し、下記のようにApa I とXho I 認識配列を隣接 (flank) させる：

オリゴヌクレオチド 1 : 5'-GATCTCTACGGTGGTCCTAAATAGTC-3' (配列番号 1)

オリゴヌクレオチド 2 : 5'-TCGAGACTATTTAGGACCAACCGTAGAGATGGGCC-3' (配列番号 2)

オリゴヌクレオチド 2 : 5'-TCGAGACTATTTAGGACCAACCGTAGAGATGGGCC-3' (配列番号 2)

TCGAGACTATTTAGGACCAACCGTAGAGATGGGCC (配列番号 2)

上記のオリゴヌクレオチドを10mMのMg<sup>2+</sup>の存在下で混合し、5分間100℃に加熱し、ゆっくり室温に冷却する。アニーリングしたオリゴヌクレオチドを、以下のように調製した挿入体：pKSSINBVdIJRベクターのモル比25：1で結合する。Xho I による完全な消化、次に1分子当たり (可能な2つの切断のうち) 1つのApa I 誘導切断がもたらす部分的条件下でApa I による消化、10,655塩基対断片のゲル精製、そしてCIAPによる処理。不活性化した結合領域核中で停止し、合成結合領域核に結合し、そして複製に必要な3' ウイルス成分が後に続き、pKSSINBVプラスミドに含有されている、全NSPコード領域を含有するこのベクターを、pKSSINdIJRsircと呼ぶ。

サブゲノムmRNA合成のレベルを制御するために、プラスミドpKSSINdIJRsirc中に縦列で挿入された合成結合領域核をさらに修飾する

。結合領域核のこれらの修飾は2つのアプローチにより行われる：結合領域核内のヌクレオチド変化、または本物のウイルス配列によると隣接するシンドビスヌクレオチド5' および3' 結合領域核末端での延長。ウイルスヌクレオチド7579

-7602にわたる最小結合領域核を以下に示す：

ATCTCTACGGTGGTCCTAAATAGT (配列番号\_\_)

8種類のアルファウイルス内のゲノム配列を比較することにより、結合領域核内に配列の多様性があることが証明されている。特定の結合領域の位置について、シンドビスヌクレオチドの後に、他のウイルスで見いだされる対応するヌクレオチドを以下に示す：

ヌクレオチド		許容される
番号	シンドビス	変化
7579	A	C
7580	U	C
7581	C	U
7583	C	G
7589	U	C
7590	G	U
7591	G	A
7592	U	A
7600	A	U または G
7602	U	G または A

シンドビスヌクレオチド7579, 7580, 7581, 7583, 7589, 7590, 7591, 7592の結合領域の変化は、結合領域内で重複するNSP4のカルボキシ末端のすべての5個のコドン内の、アミノ酸コーディング能の変化につながる。NSP4コーディング能のレベルと結合領域対活性のレベルでのアルファウイルス間の結合領域中に見られる変化は

、機能に影響しないNSP4と結合領域中の許容変化か、または他方で単に異なるウイルスであることのいずれかを示すか、またはその両方を表しているのかも知れない。いずれにしてもここに示した結合領域の変化はそこからNSP蛋白の合成は起きない縦列に挿入された結合領域核に関する。前述のように全NSP領域の翻訳はpKSSINBVd1JR作成体から起きる。シンドビスヌクレオチド7600と7602の結合領

域の変化は、NSP4停止コドンの下流で構造蛋白開始コドンの上流にある。

いくつかのアルファウイルス株の間で観察される結合領域核内のヌクレオチドの差異の位置を、本明細書中では許容変化と呼ぶ。いくつかのアルファウイルス株の間で観察される結合領域核内のヌクレオチドの位置を、本明細書中では非許容変化と呼ぶ。

合成結合領域核からのサブゲノムmRNA開始のレベルを低下させるために、許容変化に対応するヌクレオチド内と非許容変化に対応するヌクレオチド内で別々に変化させる。許容変化に対応する結合領域ヌクレオチドは上記の表に示す。配列決定した8種類のアルファウイルスの間で変化が見られない14の結合領域ヌクレオチド（セムリキ森林ウイルス、ミドルバーグウイルス、ロスリバーウイルス、オニオンヨンウイルス、イースタン馬脳炎ウイルス、ウェスタン馬脳炎ウイルスそしてベネズエラ馬脳炎ウイルス）を以下に示す。

ヌクレオチド番号：

7582

7584

7585

7586

7587

7588

7593

7594

7595

7596

7597

7598

7599

7601

アルファウイルスの間で観察される結合領域の変化は、特定のアルファウイル

スRNAポリメラーゼとその同じ起源の結合領域の間の相互作用を反映するのもかも知れない。すなわち、「許容」ヌクレオチド間の変化は、結合領域の「非許容」ヌクレオチド間の変化と同様に、サブゲノムmRNA合成レベルを顕著に低下させるかも知れない。一方これらは、結合領域核内の許容変化の部位かも知れない。

結合領域核内の1つの本物の非許容変化は、サブゲノムmRNA開始点に対応するシンドビスヌクレオチド7598のようである。プラスミドpKSSINdIJRsircの縦列に挿入された結合領域核のヌクレオチド変化は、ここでは記載していない。

合成最小-19->+5結合領域核内の全体の許容ヌクレオチドの置換は、インビトロで合成され、Apa IとXho I認識配列が隣接する

以下に示すように、この置換は、以下のオリゴヌクレオチド対で行われる：

以下のオリゴヌクレオチド対で行われる：

オリゴヌクレオチド1：CCCTTGACGGCTAACCTAAAGGAC（配列番号\_\_）

オリゴヌクレオチド2：TCGAGTCCTTTAGGTTAGCCGTACAAGGGGGCC（配列番号\_\_）

TCGAGTCCTTTAGGTTAGCCGTACAAGGGGGCC（配列番号\_\_）

上記のオリゴヌクレオチドを10mMのMgの存在下で混合し、5分間100℃に加熱し、ゆっくり室温に冷却する。アニーリングしたオリゴヌクレオチドを、以下のよう

に調製した挿入体：pKSSINBVdIJRベクターのモル比25：1で結合する：Xho Iによる完全な消化、次に1分子当たり（可能な2つの切断のうち）1つのApa I誘導切断がもたらす部分的条件下でApa Iによる消化、1分子当たり（可能な2つの切断のうち）1つのApa I誘導切断がもたらされ、10,655塩基対断片のゲル精製、そしてCIAPによる処理。このベクターを、pKSSINdIJRsircと呼ぶ。

結合領域核内の13個の非許容ヌクレオチド（ヌクレオチド7598は変化していない）のそれぞれを、以下の規則により、大きな塩基変換を行う：

A->C

T->G

G->T

C->A

例えば、インビトロで合成され、Apa IとXho I認識配列が隣接する以下のオリ

ゴヌクレオチド対を用いてヌクレオチド7582をTからGに変化させる：

オリゴヌクレオチド1：

CATCGCTACGGTGGTCCTAAATAGTC (配列番号\_\_)

オリゴヌクレオチド2：

TCGAGACTATTTAGGACCACCGTAGCGATGGGCC (配列番号\_\_)

(非許容結合領域部位の塩基変換を起こすヌクレオチド配列太字で示す)

上記のオリゴヌクレオチドを10mMの $Hg^{2+}$ の存在下で混合し、5分間100℃に加熱し、ゆっくり室温に冷却する。アニーリングしたオリゴヌクレオチドを、以下のように調製した挿入体：pKSSINBvdIJRベクターのモル比25：1で結合する：Xho I による完全な消化、次に1分子当たり（可能な2つの切断のうち）1つのApa I 誘導切断がもたらす部分的条件下でApa I による消化、1分子当たり（可能な2つの切断のうち）1つのApa I 誘導切断がもたらされ、10,655塩基対断片のゲル精製、そしてCIAPによる処理。このベクターを、pKSSINdIJRs jr7582と呼ぶ。

前述の変換規則を用いて、Apa I とXho I 認識配列が隣接する前述の12個の別々のオリゴヌクレオチド対を用いて、結合領域核の12個の残存する非許容部位を変化させる。これらのベクターは以下のように呼ぶ。

pKSSINdIJRs jrNP7584

pKSSINdIJRs jrNP7585

pKSSINdIJRs jrNP7586

pKSSINdIJRs jrNP7587

pKSSINdIJRs jrNP7588

pKSSINdIJRs jrNP7593

pKSSINdIJRs jrNP7594

pKSSINdIJRs jrNP7595

pKSSINdIJRs jrNP7596

pKSSINdIJRs jrNP7597

pKSSINdIJRs jrNP7599



## pKSSINd1JRsjrNP7601

サブゲノムmRNA合成の相対的レベルを試験するために、ルシフェラーゼレポーター遺伝子を、修飾された縦列結合領域ベクター中に挿入する。この作成は、縦列に挿入された合成結合領域核ベクターをXho I とSac I で消化し、CIAPで処理し、得られる約10,200塩基対断片をゲル精製することにより行われる。こうして処理したベクター断片を、Xho I とSac I のよるpKSSINd13' SIN-lucの消化により得られる2854塩基対の小断片と結合させる。これらの作成体は、不活性化結合領域中のシンドビスヌクレオチド7597で停止する全シンドビス非構造遺伝子コード領域、縦列に挿入された合成結合領域核（修飾されているかまたは修飾されていない）、ホタルのルシフェラーゼ遺伝子、およびゲノム複製に必要な3' ウィルス成分を含有する。これらのベクターの名前は以下の通りである：

シンドビスルシフェラーゼベクター	縦列に挿入した結合領域の修飾
pKSSINd1JRsjrc-luc	修飾されていない
pKSSINd1JRsjrPc-luc	許容変化
pKSSINd1JRsjrNP7582-luc	非許容変化
pKSSINd1JRsjrNP7584-luc	"
pKSSINd1JRsjrNP7585-luc	"
pKSSINd1JRsjrNP7586-luc	"
pKSSINd1JRsjrNP7587-luc	"
pKSSINd1JRsjrNP7588-luc	"
pKSSINd1JRsjrNP7593-luc	"
pKSSINd1JRsjrNP7594-luc	"
pKSSINd1JRsjrNP7595-luc	"
pKSSINd1JRsjrNP7596-luc	"
pKSSINd1JRsjrNP7597-luc	"
pKSSINd1JRsjrNP7599-luc	"
pKSSINd1JRsjrNP7601-luc	"

直前に示したすべてのルシフェラーゼベクターの翻訳効率が同じであると仮定

して、BHK-21細胞によるトランスフェクションの16時間後にルシフェラーゼ産生のレベルを比較することによりサブゲノム合成の相対的レベルを測定する。サブゲノム転写の相対的レベルは、ベクターpKSSINBV-lucとpKSSINd1JRsjrc-lucによるルシフェラーゼ産生を、前記の修飾された結合領域ルシフェラーゼベクターのすべてと比較することにより測定する。

縦列に挿入された合成結合領域核 (pKSSINd1JRsjrcとその誘導体) を含有するベクターは、pKSSINBV作成体に比較してサブゲノムmRNA発現のレベルが低いことが予測される。ある実施態様においては

、pKSSINd1JRsjrcベクターから観察されるサブゲノムmRNA発現のレベルを上げることが必要かも知れない。これは、本物のウイルス配列に従って、5' および3' 合成結合領域核末端を11個の追加の隣接シンドビスヌクレオチドで延長することにより行われる。

以下に示す合成オリゴヌクレオチド対はインビトロで合成され、最小結合領域核の24ヌクレオチド (太字で示してある) を含む46個のシンドビスヌクレオチドを含有する。シンドビスヌクレオチドは、以下に示すようにAPa I とXho I が隣接している：

オリゴヌクレオチド1：

CGGAAATAAAGCATCTCTACGGTGGTCCTAAATAGTCAGCATAGT

ACC (配列番号\_\_)

オリゴヌクレオチド2：

TCGAGGTACTATGCTGACTATTTAGGACCACCGTAGAGATGCTTTA

TTTC-CGGGCC (配列番号\_\_)

上記のオリゴヌクレオチドを10mMのMgの存在下で混合し、5分間100℃に加熱し、ゆっくり室温に冷却する。アニーリングしたオリゴヌクレオチドを、以下のよう調製した挿入体：pKSSINBVd1JRベクターのモル比25：1で結合する：Xho I による完全な消化、次に1分子当たり (可能な2つの切断のうち) 1つのApa I 誘導切断がもたらす部分的条件下でApa I による消化、10,655塩基対断片のゲル精製、そしてCIAPによる処理。不活性化した結合領域核中で停止し、延長した

合成結合領域に結合し、そして複製に必要な3' ウイルス成分が後に続き、pKS II+プラスミドに含有されている、全NSPコート領域を含有するこのベクターを、pKSSINdIJRsircと呼ぶ。

サブゲノムmRNA合成の相対的レベルを試験するために、ルシフェラーゼレポーター遺伝子を、延長された縦列結合領域pKSSINdIJRsexjrベクター中に挿入する。この作成は、pKSSINdIJRsexjrプラス

ミドをXho I とSac I で消化し、CIAPで処理し、得られる約10,200塩基対断片をゲル精製することにより行われる。こうして処理したベクター断片を、Xho I とSac I のよるpKS II 3' SIN-lucの消化により得られる2854塩基対の小断片と結合させる。この作成体は、不活性化結合領域中のシンドビスヌクレオチド7597で停止する全シンドビス非構造遺伝子コード領域、縦列に挿入された延長合成結合領域、ホタルのルシフェラーゼ遺伝子、およびゲノム複製に必要な3' ウイルス成分を含有する。このベクターの名前はpKSSINdIJRsexjr-lucである。

サブゲノム転写の相対的レベルは、ベクターpKSSINBV-lucとpKSSINdIJRsirc-lucベクターによるルシフェラーゼ産生を、pKSSINdIJRsexjr-lucによるルシフェラーゼ産生と比較することにより測定する。

#### 実施例 4

##### A. シンドビスベクターへのアデノウイルス初期領域E3遺伝子の挿入

繰り返し投与による治療が必要な場合のベクター感染細胞中で発現されるウイルス特異的蛋白に対する宿主CTL指向応答を阻害するために、アデノウイルス2型 (Ad2) E3/19K遺伝子ATCC VR-846を、pKSSINdIJRsircプラスミドの結合領域核のすぐ下流にクローン化する。

簡単に説明すると、Ad2を許容細胞株（例えば、Hela細胞またはVero細胞）中で増殖させ、細胞変性作用が確認された後、細胞溶解液からピリオンを精製し、ウイルスからAd2 DNAを精製する。

Ad2 DNA E3/19K遺伝子（アミノ末端シグナル配列を含有し、後にE3 19K蛋白がそれ自身を小胞体内に埋め込ませる管腔内 (intraluminal) ドメインとカルボキシ末端細胞質性テールが続く）を、ウイ

ルスヌクレオチド28,812と29,288の間に位置させる。ウイルスゲノムDNAからのAd2 E3 19K遺伝子の単離は、以下のプライマー対を用いてPCR増幅により行われる：

Ad2 E3順方向プライマー（Ad2ヌクレオチド28,812～28,835）：

5'-TAT ATC TCC AGA TGA GGT ACA TGA TTT TAG GCT TG-3'

（配列番号14）

Ad2 E3逆方向プライマー（Ad2ヌクレオチド29,241～29,213）：

5'-TAT ATA TCG ATT CAA GGC ATT TTC TTT TCA TCA ATA AAA

C-3'（配列番号15）

Ad2相補的配列に加えて、両方のプライマーは、PCR増幅アンプリコン生成物の効率的な酵素消化のための5つのヌクレオチド「緩衝配列」をその5'末端に含有する。順方向プライマーの配列の後にはXho I 認識部位が続き、逆方向プライマーでは配列の後にCla I 認識部位が続く。すなわち5'から3'方向に、E3/19K遺伝子はXho I とCla I 認識部位が隣接している。Ad2 DNAからのE3/19K遺伝子の増幅は、以下のPCRサイクルプロトコルを用いて行われる：

温度（℃）	時間（分）	周期番号
94	2	1
94	0.5	
55	0.17	5
72	3.5	
94	0.5	30
70	3.5	
72	10	10

増幅に続いて、1.5%アガロースゲル上で451塩基対のアンプリコンが精製され、次にXho I とCla I 酵素で消化され、あらかじめ

Xho I とCla I で消化したCIAPで処理したpKSSINd1JRsjrcプラスミドに結合させる。このプラスミドpKSSINd1JRsjrcAdE3と命名する。同じクローニング戦略を用いて、実施例2に記載の修飾合成結合領域ベクターのすべてにAd2 E3/19K遺伝子

を挿入する。

#### B. シンドビスベクターへのヒトサイトメガロウイルスH301遺伝子の挿入

繰り返し投与による治療が必要な場合のベクター感染細胞中で発現されるウイルス特異的蛋白に対する宿主CTL指向応答を阻害するために、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) H301遺伝子を、pKSSINd1JRsjrcプラスミドの結合領域核のすぐ下流にクローン化する。

簡単に説明すると、HCMV AD169株(ATCC VR-538)を許容細胞株 (例えば、初期ヒト包皮繊維芽細胞 (HFF) (GIBCO/BRL、ガイザースバーグ (Gaithersburg)、メリーランド州) 中で増殖させ、細胞変性作用が確認された後、細胞溶解液からビリオンを精製し、ウイルスからHCMV DNAを精製する。

HCMV H301遺伝子を、ウイルスヌクレオチド23,637と24,742の間に位置させる。ウイルスゲノムDNAからのHCMV H301遺伝子の単離は、以下のプライマー対を用いてPCR増幅により行われる。

HCMV H301順方向プライマー (緩衝配列/Xho I 部位/HCMヌクレオチド23,637~23,660) :

5'-TAT ATC TCC AGA TGA TGA CAA TGT GGT GTC TGA CG-3'

(配列番号16)

HCMV H301逆方向プライマー (緩衝配列/Cla I 部位/HCMヌクレオチド24,744~24,722) :

5'-TAT ATA TCG ATT CAT GAC GAC CGG ACC TTG CG-3'

(配列番号17)

HCMV H301遺伝子相補的配列に加えて、両方のプライマーは、PCR

R増幅アンプリコン生成物の効率的な酵素消化のための5つのヌクレオチド「緩衝配列」をその5'末端に含有する。順方向プライマーの配列の後にはXho I 認識部位が続き、逆方向プライマーでは配列の後にCla I 認識部位が続く。すなわち5'から3'方向に、HCMV H301遺伝子はXho I とCla I 認識部位が隣接している。HCMV DNAからのHCMV H301遺伝子の増幅は、以下のPCRサイクルプロトコールを用いて行われる:

温度 (°C)	時間 (分)	周期番号
94	2	1
94	0.5	
55	0.17	5
72	3.5	
94	0.5	30
70	3.5	
72	10	10

増幅に続いて、1.0%アガロースゲル上で1,129塩基対のアンプリコン生成物が精製され、次にXho I とCla I 酵素で消化され、あらかじめXho I とCla I で消化したCIAPで処理したpKSSIND1JRsjrcプラスミドに結合させる。このプラスミドpKSSIND1JRsjrcH301と命名する。同じクローニング戦略を用いて、実施例3に記載の修飾合成結合領域ベクターのすべてにHCMV H301遺伝子を挿入する。

#### 実施例5

##### シンドビスベクターからの多数の異種遺伝子の発現

プラスミドpBS-ECAT (Jangら、J. Virol 63 : 1651, 1989) は、内部リボザイム侵入部位 (IRES) を含有する、ウイルスゲノムのヌクレオチド260~848からの脳心筋炎ウイルス (EMCV) の5' 非翻訳領域を含む。EMCVヌクレオチド260~848は、以下のプライマー

を用いてPCRによりpBS-ECATから増幅される：

EMCV IRES順方向プライマーA (Apa I 部位でベクターpKSSIND1JRの無能化した結合領域の隣への挿入のため)：

5'-TAT ATG GGC CCC CCC CCC CCC AAC G-3'

(配列番号18)

EMCV IRES順方向プライマーB (Cla I 部位で停止し、Nco I 部位で開始する異種遺伝子の間への挿入のため)：

5'-TAT ATA TCG ATC CCC CCC CCC CCC CCA ACG-3'

(配列番号19)

EMCV IRES逆方向プライマー、(プライマーAまたはBとともに使用される) :

5'-TAT ATC CAT GGC TTA CAA TCG TGG TTT TCA AAG G-3' (配列番号20)

順方向プライマーAと逆方向プライマーによる増幅から得られるアンプリコンは、5塩基対「緩衝配列」内でApa I (5'-Nco I 認識部位が隣接している。

順方向プライマーBと逆方向プライマーによる増幅から得られるアンプリコンは、5塩基対「緩衝配列」内でCla IとNco I 認識部位が隣接している。

pBS-ECATプラスミドからのEMCV IRES配列の増幅は、以下のPCRサイクルプロトコールを用いて行われる:

温度 (°C)	時間 (分)	周期番号
94	2	1
94	0.5	
55	0.17	5
72	3.5	
94	0.5	30
70	3.5	
72	10	10

pKSSINBVd1JRベクターへの挿入のために、589塩基対のアンプリコンをApa I とNco I で消化し、1%アガロースゲル上で精製し、Apa I とNco I で消化したCIAPで処理したベクターに結合させる。EyiCV IRES挿入体のすぐ下流に挿入される異種遺伝子の開始コドンに対応するATGは、Nco I 部位 (CCATGG) を含有するように修飾する。

異種遺伝子の間のpKSSINBVまたはpKSSINBVd1JRsjrcベクターへの挿入のために、589塩基対のアンプリコンをApa I とNco I で消化し、1%アガロースゲル上で精製し、Apa I とNco I で消化しCIAPで処理した2シストロン性異種遺伝子ベクターに結合させる。2シストロン性異種遺伝子の構造では、上流異種遺伝子の3'末端はCla I 認識部位で停止するように修飾される。EMCV IRES挿入体のすぐ下流に挿入される第2の下流異種遺伝子の開始コドンに対応するATGは、Nco I 部位 (

CCATGG) を含有するように修飾する。すなわち 5' から 3' へ、成分は以下の順序である：pKSSINBVまたはpKSSINBVdIJRsjrc-遺伝子#1-Cla/Nco EMCV IRES遺伝子#2-3' SIN。修飾された結合領域のすべての実施例2に記載のベクターへの挿入は、pKSSINBVまたはpKSSINBVdIJRsjrcベクターについてここで記載した戦略に従う。

2 シストロン性異種構造を含有するpKSSINBVdIJRベクターは、前述の各EHCV IRESアンプリコンを用いて作成される。前述のように最初のEMCV IRESアンプリコンはApa I とNco I 部位が隣接し、Apa I 部位で無能化した結合領域のすぐ下流に挿入される。このEMCV IRES配列の後に、Cla I 認識部位で停止する最初の異種遺伝子が続く。この最初の異種遺伝子の後に、Cla I とNco I 認識部位に隣接されるアンプリコンを用いて、第2のEMCV IRES配列が続く。第2の異種遺伝子は第2のEMCV IRES配列の後に続く。すなわち 5' から 3' へ、成分は以下の順序である：SINBVdIJR-Apa/Nco EMCV IRES遺伝子#1-Cla/Nco EMCV IRES遺伝子#2-3' SIN。

プラスミドpP2-5' (Pelletierら、Mol. Cell Biol. 8 : 1103, 1988) は、ウイルスゲノム (ポリオIRESを含有する) のヌクレオチド1~1,872からのポリオウイルスP2/ランシング(Lansing)株の5' 非翻訳領域を含む。ポリオウイルスヌクレオチド320~631は、以下のプライマー対を用いてPCRによりpP2-5' から増幅される：

ポリオIRES順方向プライマーA (Apa I 部位でベクターpKSSINBVdIJRの無能化した結合領域の隣への挿入のため)：

5'-TAT ATG GGC CCT CGA TGA GTC TGG ACG TTC CTC-3'

(配列番号21)

ポリオIRES順方向プライマーB (Cla I 部位で停止しNco I 部位で開始する異種遺伝子の間への挿入のため)：

5'-TAT ATA TCG ATT CGA TGA GTC TGG ACG TTC CTC-3'

(配列番号22)

ポリオIRES逆方向プライマー (プライマーAまたはBとともに使用される)：



5'-TAT ATC CAT GGA TCC AAT TTG CTT TAT GAT AAC AAT C-3'

(配列番号23)

上記のポリオIRES順方向プライマーA／逆方向プライマー対によるPCRから得られるアンプリコンは、5塩基対「緩衝配列」内でApa I とNco I 認識部位が隣接している。

上記のポリオIRES順方向プライマーB／逆方向プライマー対によるPCRから得られるアンプリコンは、5塩基対「緩衝配列」内でCla I とNco I 認識部位が隣接している。

pP2-5'プラスミドからのポリオIRES配列の増幅は、実施例5のPCRプロトコルを用いて行われる：

pKSSINBVd1JRベクターへの挿入のために、333塩基対のアンプリコンをApa I とNco I で消化し、1.5%アガロースゲル上で精製し、Apa I とNco I で消化しCIAPで処理したベクターに結合させる。ポリオIRES挿入体のすぐ下流に挿入される異種遺伝子の開始コドンに対応するATGは、Nco I 部位 (CCATGG) を含有するように修飾する。

異種遺伝子の間のpKSSINBVまたはpKSSINBVd1JRsjrcベクターへの挿入のために、333塩基対のアンプリコンをCla I とNco I で消化し、1.5%アガロースゲル上で精製し、Cla I とNco I で消化しCIAPで処理した2シストロン性異種遺伝子ベクターに結合させる。2シストロン性異種遺伝子の構造では、上流異種遺伝子の3'末端はCla I 認識部位で停止するように修飾される。ポリオIRES挿入体のすぐ下流に挿入される第2の下流異種遺伝子の開始コドンに対応するATGは、Nco I 部位 (CCATGG) を含有するように修飾する。すなわち5'から3'へ、成分は以下の順序である：pKSSINBVまたはpKSSINBVd1JRsjrc-遺伝子#1-Cla/NcoポリオIRES遺伝子#2-3'SIN。修飾された結合領域のすべての実施例3に記載のベクターへの挿入は、pKSSINBVまたはpKSSINBVd1JRsjrcベクターについてこ

こで記載した戦略に従う。

2シストロン性異種構造を含有するpKSSINBVd1JRベクターは、前述の各ポリオ

IRESアンプリコンを用いて作成される。前述のように最初のポリオIRESアンプリコンはApa I とNco I 部位が隣接し、Apa I 部位で無能化した結合領域のすぐ下流に挿入される。このポリオIRES配列の後に、Cla I 認識部位で停止する最初の異種遺伝子が続く。この最初の異種遺伝子の後に、Cla I とNco I 認識部位に隣接されるアンプリコンを用いて、第2のポリオIRES配列が続く。第2の異種遺伝子は第2のポリオIRES配列の後に続く。すなわち5' から3' へ、成分は以下の順序である：SINBVd1JR-Apa/NcoポリオIRES遺伝子#1 - Cla/Nco EMCV IRES遺伝子#2 - 3' SIN。

ヒト免疫グロブリン重鎖結合蛋白mRNAの5' リーダー領域に対応する220塩基対BiP cDNAは、PCRを用いてクローンpGEM5ZBiP 5' から増幅される。BiP cDNAに対応する配列は、元々ヒトGRP78遺伝子(Ting and Lee, DNA 7: 275-286, 1988)のバクテリオファージラムダhu28-1中で決定された。このPCR反応で使用される順方向プライマーは、BiP cDNAが挿入されるシンドビスベクターに依存して異なる。このPCR反応の逆方向プライマーは、シンドビスベクターと同じである。

シンドビスベクターpKSSINBVd1JRの無能化した結合領域のすぐ下流への挿入のためのプラスミドからのpGEM5ZBiP 5' からのBiP cDNA配列の増幅は、以下の順方向プライマーを用いて行われる：

5'-TAT ATG GGC CCG GTC GAC GCC GGC CAA GAC-3'

(配列番号24)

ヌクレオチド12で始まるBiP cDNA相補的配列に加えて、このプライマーは、PCRアンプリコン生成物の効率的な酵素消化のための5つのヌクレオチド「緩衝配列」をその5' 末端に含有する。この配

列の後にApa I 認識部位が続く。

シンドビスベクターpKSSINBVまたはpKSSINBVd1JRsjrcへの挿入のためのpGEM5ZBiP 5' プラスミドからのBiP cDNA配列の増幅は、下記の順方向プライマーを用いて増幅により行われる。これらのベクターについては、BiP cDNAは、シンドビス構造遺伝子に対応する領域に入れられる2つの異種遺伝子の間に挿入される。

5'-TAT ATA TCG ATG GTC GAC GCC GGC CAA GAC-3'

## (配列番号25)

ヌクレオチド12で始まるBiP cDNA相補的配列に加えて、このプラスミドは、PCRアンプリコン生成物の効率的な酵素消化のための5つのヌクレオチド「緩衝領域」をその5'末端に含有する。この配列の後にCla I 認識部位が続く。

シンドビスベクターpKSSINBVd1JR、pKSSINBVまたはpKSSINBVd1JRsjrcへの挿入のためのpGEM5ZBiP 5' プラスミドからのBiP cDNA配列の増幅のための逆方向プライマーは、以下のものである：

5'-TAT ATC CAT GGT GCC AGC CAG TTG GGC AGC AG-3'

## (配列番号26)

ヌクレオチド12で始まるBiP cDNA相補的配列に加えて、逆方向プライマーは、PCRアンプリコン生成物の効率的な酵素消化のための5つのヌクレオチド「緩衝配列」をその5'末端に含有する。この配列の後にNco I 認識部位が続く。

pGEM5ZBiP 5' からのBiP cDNAの増幅は、前述のPCRプロトコールを用いて行われる：

pKSSINBVd1JRベクターへの挿入のために、242塩基対のアンプリコンをApa I と Nco I で消化し、2 %アガロースゲル上で精製し、Apa I とNco I で消化しCIAPで処理したベクターに結合させる。BiP cDNA挿入体のすぐ下流に挿入される異種遺伝子の開始コドンに対

応するATGは、Nco I 部位 (CCATGG) を含有するように修飾する。

異種遺伝子の間のpKSSINBVまたはpKSSINBVd1JRsjrcベクターへの挿入のために、

242塩基対のアンプリコンをCla I とNco I で消化し、2 %アガロースゲル上で精製し、Cla I とNco I で消化しCIAPで処理した2シストロン性異種遺伝子ベクターに結合させる。2シストロン性異種遺伝子の構造では、上流異種遺伝子の3'末端はCla I 認識部位で停止するように修飾される。BiP cDNA挿入体のすぐ下流に挿入される第2の下流異種遺伝子の開始コドンに対応するATGは、Nco I 部位 (CCATGG) を含有するように修飾する。すなわち5' から3' へ、成分は以下の順序である：pKSSINBVまたはpKSSINBVd1JRsjrc-遺伝子#1-Cla/Nco BiP cDNA遺伝子#2-3' SIN。修飾された結合領域のすべての実施例2に記載のベクター

への挿入は、pKSSINBVまたはpKSSINBVd1JRsjrcベクターについてここで記載した戦略に従う。

2 シストロン性異種構造を含有するpKSSINBVd1JRベクターは、前述の各BiP cDNAアンプリコンを用いて作成される。前述のように最初のBiP cDNAアンプリコンはApa I とNco I 部位が隣接し、Apa I 部位で無能化した結合領域のすぐ下流に挿入される。このBiP配列の後に、Cla I 認識部位で停止する最初の異種遺伝子が続く。この最初の異種遺伝子の後に、Cla I とNco I 認識部位に隣接されるアンプリコンを用いて、第2のBiP cDNA配列が続く。第2の異種遺伝子は第2のBiP配列の後に続く。すなわち5' から3' へ、成分は以下の順序である：SINBVd1JR-Apa/Nco BiP遺伝子# 1 - Cla/Nco BiP遺伝子# 2 - 3' SIN。

リボザイム読み通しを促進する配列は、pKSSINBVd1JRベクター中の無能化した結合領域のすぐ下流に入れられ、これは非構造遺伝子停止から異種遺伝子へのベクターmRNAのリボゾームスキヤニングを

可能にする。この異種蛋白はリボゾームスキヤニングによりゲノム長mRNAから発現される。このベクターで感染された細胞中でサブゲノム転写は起きないため、これは感染標的細胞の寿命を延長させるはずである。さらにこれらの同じリボゾームスキヤニング配列は、ポリシストロン性サブゲノムmRNAに含有される異種遺伝子の間に入れられる。pKSSINBVd1JRベクター中とポリシストロン性mRNA領域中の異種遺伝子の間に使用されるリボゾームスキヤニング配列は、以下の通りである：

5'-TTA ATT AAC GGC CGC CAC CAT GG-3' (配列番号27)

太字のゴドンは、それぞれオーカー停止コドンとAUG開始コドンである。停止コドンの周りの下線を引いた塩基はPac I 認識部位であり、開始コドンの周りの下線を引いた塩基はNco I 認識部位である。すでの証明されているように(Levinら、Gene 108:167-174, 1991)、開始コドンと停止コドンの間の15塩基対のシストロン間距離は効率的なりボゾーム読み通しを可能にする。塩基-9から+1までのATG開始コドンの周りの配列は、効率的な翻訳開始のためのKozakコンセンサス配列(Kozak, Cell 44:283-292, 1986)に一致する。可能な場合はカルボ

キシ末端アミノ酸に対応する3'末端ヌクレオチドを、部位特異的突然変異誘発によりTに変化させる。また下流のシストロン中のアミノ末端アミノ酸に対応する5'末端ヌクレオチドは、部位特異的突然変異誘発によりGに変化させる。

異種遺伝子間、または前述のように修飾したベクターpKSSINBVd1JR中の無能化した結合領域の下流へのシストロン間配列(intercistronic sequence)の挿入は、融和性のあるPac I /Nco I 末端中に以下の2本鎖オリゴヌクレオチド対を挿入することにより行われる：

読み通しセンスオリゴヌクレオチド：

5'-TAA CGG CCG CCA C-3' (配列番号28)

読み通しアンチセンスオリゴヌクレオチド：

5'-CCA TGG TGG CGG CCG TTA AT-3' (配列番号29)

上記のオリゴヌクレオチドを10mMのMgCl<sub>2</sub>の存在下で等モル量で混合し、95℃で5分間加熱し、次にゆっくり室温に冷却して、Pac I とNco I 部位が隣接する目的のシストロン間配列を得る。次にこのシストロン間配列を、Pac I とNco I 融和性部位を含有する適当なベクター中に結合させる。

#### 実施例 6

#### 同時パッケージングによる多数の異種遺伝子の発現

本発明の1つの面で記載したように、シンドビス非構造蛋白遺伝子と構造蛋白遺伝子は、もし各RNAが複製とパッケージングに必要なcis作用性配列を含有するならば、複製能力を有する別々の陽性センスRNA分子として、同時パッケージングされることができる。従ってこの面において、同時パッケージングされたオーラ(Aura) ウイルスRNA断片はまた、オーラRNAの転写を開始することができる5'配列、オーラウイルスRNAポリメラーゼ認識配列、そしてRNAパッケージング配列の少なくとも1つのコピーを含有する。同時パッケージングされたRNA分子の少なくとも1つは、オーラウイルス非構造蛋白をコードする配列を含有しなければならない。本発明の好適な実施態様において、同時パッケージングされる1つまたはそれ以上のRNA断片はまた、異種遺伝子が後に続くウイルス結合領域を含有するであろう。

## A. 多数の発現のための同時パッケージングした発現カセットの作成

### 1. 異種遺伝子

多数の異種遺伝子の発現を可能にする同時パッケージングの実用

性を証明するために、2つのベクター作成体を作成した。第1の作成体は、シンドビスウイルスRNAの転写を開始することができる5'配列、パッケージングに必要なRNAシンドビスRNA配列、非構造蛋白1～4の合成をコードする配列、シンドビス結合領域、ルシフェラーゼ遺伝子、そして負の鎖RNAの合成に必要なシンドビス3'配列よりなる。第2の作成体は、シンドビスウイルスの転写を開始することができる5'配列、シンドビス結合領域、パッケージングに必要なシンドビス配列、LacZ遺伝子をコードする配列、そして負の鎖RNAの合成に必要な3'配列よりなる。1つのパッケージング細胞株にトランスフェクションされたこれらの作成体のRNA転写体は、同時パッケージングされてルシフェラーゼと $\beta$ -ガラクトシダーゼの発現を同じ真核細胞に移行させることができるベクター粒子を産生する。

$\beta$ -ガラクトシダーゼレポーター遺伝子をシンドビスベジックベクター (pKSSINBV) に挿入し、次にベクターからのシンドビス非構造蛋白蛋白の一部の欠させる。この作成体からのRNAを、シンドビスルシフェラーゼベクター (pKSSINBV-luc) からのRNAで同時トランスフェクションして、以下の方法の1つにより同時パッケージングさせる。同時パッケージングされたRNA発現カセットを含有するベクター粒子によるBHK-21細胞の感染させると、同じ細胞内でルシフェラーゼと $\beta$ -ガラクトシダーゼの両方を発現される。

## B. $\beta$ -ガラクトシダーゼ発現カセットの作成

lacZ遺伝子はpSV- $\beta$ -ガラクトシダーゼDNA (プロメガ社 (Promega Corp.)、マジソン、ウィスコンシン州) を酵素HindIIIとSal Iで消化することにより得られる。lacZ遺伝子を含有する3749塩基対断片を1%アガロースゲルで精製する。次にこの断片をpSP72プラスミド (プロメガ社 (Promega Corp.)) に結合させて、これはま

たHind IIIとSal Iで消化し、ジーンクリーン (Gene clean) : (バイオ101 (BIO 101)、サンジエゴ、カリフォルニア州) を用いて精製する。この作成体はpSP72-lacZと呼ぶ。プラスミドpSP72を酵素Xho IとXba Iで消化して、3767塩基対lacZ含有断片を1%アガロースゲルで精製する。次にこの断片をpKSSINBVに結合させ、これはまたXho IとXba Iで消化し、ジーンクリーン (Gene Clean) を用いて精製する。このlacZを含有するシンドビス作成体はpKSSINBV-lacZと呼ぶ。次にpKSSINBV-lacZを酵素Age Iで消化する (これはシンドビス非構造蛋白遺伝子配列のヌクレオチド3172と6922で切断する)。残存するベクター断片をジーンクリーンで精製し、その末端を再結合する。このプラスミドはシンドビス非構造蛋白遺伝子内に3750塩基対欠失を有し、機能的にこれらを不活性化する。この作成体はpKSSINBVdINSP-lacZと呼ぶ。

pKSSINBVdINSP-lacZとpKSSINBV-lusのSP 6転写体は前述のように調製される。これらのRNA転写体はパッケージング細胞内に同時トランスフェクションされ、これは前述の機構の1つによりシンドビス構造蛋白を発現する。各RNA転写体は、シンドビスウイルスの転写を開始することができる5'配列、パッケージングに必要なRNA配列、シンドビス結合領域、レポーター遺伝子、そして負の鎖RNAの合成に必要なシンドビス3'配列を含有する。pKSSINBV-luc転写体はまたシンドビス非構造蛋白を含有する。同時トランスフェクションされた細胞において両方のRNA転写体は複製され、ウイルス粒子の一部は、同じ粒子内に同時パッケージングされた両方のRNA転写体を含有する。同時パッケージングしたRNA粒子で新鮮な細胞を感染させると、ルシフェラーゼと $\beta$ -ガラクトシダーゼの両方を発現する細胞が得られる。

### C. パッケージング能を上げるための多数の発現カセットの同時パ

#### ッケージング

第VIII因子のような大きな遺伝子は同時パッケージングの恩恵を受ける。第VIII因子をコードするcDNAをシンドビスベシクベクター (pKSSINBV) に挿入すると、長さが約16kbのRNA転写体を得られる。この長さのためにこのRNAは効率的には複製やパッケージングをされないかも知れない。前述の方法を用いて、シン

シンドビス非構造蛋白と第VIII因子遺伝子は長さが約8 kbと9 kbの別々のRNA分子に分解されて、同じ粒子に同時パッケージングされる。

#### D. 第VIII因子発現カセットの作成

pKSSINBV作成体を酵素Sac I で消化する（これはシンドビス 3' 末端とポリ A 配列のすぐ後ろで切断する）。出っ張った 3' 末端を酵素T4 DNAポリメラーゼと dNTPを添加することにより平滑にし、16℃で10分間インキュベートする。消化した断片をジーンクリーンで精製し、SgrA I 認識部位を含有する12ヌクレオチドの自己相補的リンカー（5'-GTCACCGGTGAC-3'）（配列番号30）に結合させる。第VIII因子は数個のSac I 部位を含有するためこの工程は必要であり、SP6転写の前にプラスミド線状化の部位を作成するために、Sac I の代わりにSgrA I 認識部位を用いる。この作成体はpKSSINBV-SgrA I と呼ぶ。pKSSINBV-SgrA I 作成体を酵素Xba I とNot I で消化し、ジーンクリーンを用いて精製する。酵素Xba I とNot I で消化して第VIII因子cDNA配列を得る。第VIII因子をコードする8 kbの断片を1% Ageで精製し、次にXba I /Not I で消化したpKSSINBV-SgrA I に結合させる。この作成体はpKSSINBV-第VIII因子と呼ぶ。次にpKSSINBV-第VIII因子作成体を酵素Age I で消化（これはシンドビス非構造蛋白のヌクレオチド3172と6922で切断する）し、ジーンクリーンで精製し、自身に再結合させる。この作成体はシンドビス非構造蛋白内に3750塩基対欠失を有し、機能的にこれらを不活性

化する。この作成体はpKSSINBVdINSP-第VIII因子と呼ぶ。

pKSSINBVdINSP-第VIII因子とpKSSINBVのSP 6 転写体は前述のように調製される。これらのRNA転写体はパッケージング細胞内に同時トランスフェクションされ、これは前述の機構の1つによりシンドビス構造蛋白を発現する。両RNA転写体は、シンドビスウイルスの転写を開始することができる5' 配列、RNAパッケージングに必要な配列、シンドビス結合領域、そして負の鎖RNAの合成に必要なシンドビス 3' 配列を含有する。さらにpKSSINBV転写体はまだ、シンドビス非構造蛋白遺伝子を含有し、pKSSINBV-第VIII因子転写体は第VIII因子遺伝子を含有するが、シンドビス非構造蛋白遺伝子はがゆしない。同時トランスフェクションさ



れた細胞において両方のRNA転写体は複製され、ウイルス粒子の一部は、同じ粒子内に同時パッケージングされた両方のRNA転写体を含有する。同時パッケージングしたRNAでBHK-21細胞を感染させると、両RNAが同じ細胞上に存在する時のみ第VIII因子が得られる。

#### E. オーラウイルス同時パッケージングベクターの作成

シンドピスについて記載した系と類似のアルファウイルス発現系を開発するために、当該分野で公知の方法および本発明内に記載した具体的な方法を使用することができる。ウイルスはATCCから得られ、細胞を培養して増殖させ、ウイルスのRNAを抽出し、全ゲノムにわたるcDNAを合成紙、従来法を用いてクローン化する。次にこのcDNAを用いて、シンドピスの特許で記載したものと原則的に類似の遺伝子移行ベクター系を作成する。これは、異種遺伝子を運搬することができるレプリコン、構造蛋白遺伝子を発現するパッケージング細胞株、そして本系に独特の、追加の異種遺伝子を運搬できる別のパッケージング能を有するサブゲノムベクターよりなるが、これらに限定されない。オーラウイルスサブゲノムRNAはパッケージング

シグナルを含有するため、異種遺伝子で置換中の不活性化を防止するために、この配列を同定するために予備的な実験をする必要がある。パッケージング配列の同定の後に、オーラベースの系の各成分を作成する。以下の最小条件を含有する基本的レプリコンベクターが作成される：複製に必要なオーラ5'配列、非構造蛋白コード領域、サブゲノムmRNA合成のための修飾されたまたは修飾されていない結合領域、異種遺伝子の挿入のための多数のクローニング部位、1つまたはそれ以上のパッケージングシグナル、そして複製に必要な3'オーラ配列（ポリアデニル酸配列を含む）。レプリコンRNAのインビトロ転写のために上流のバクテリオファージRNAポリメラーゼプロモーターが使用される。あるいは、cDNAから直接転写するために、真核細胞RNAポリメラーゼプロモーターが使用される。

以下の最小条件を含有するパッケージング能のあるサブゲノムベクターが作成される：修飾されたまたは修飾されていない結合領域、異種遺伝子の挿入のための多数のクローニング部位、1つまたはそれ以上のパッケージングシグナル、複

製／負の鎖の合成に必要な3' オーラ配列（ポリアデニル酸配列を含む）。このサブゲノムベクターはある場合には、ベクターがアンプリコンとして作用するようにするため、オーラ5' レプリコンが結合領域の上流に配置されるように作成される。サブゲノムベクターRNAの転写は、バクテリオファージRNAポリメラーゼプロモーターを用いてインビトロで、または真核細胞RNAポリメラーゼプロモーターを用いてインビボで行われる。さらに最初の転写体はセンス構造でもまたはアンチセンス構造でもよい。

1つまたはそれ以上の構造蛋白のmRNAが結合領域から転写されオーラレプリコンに誘導されるように、シンドビスベクターについてパッケージング細胞株が作成される。他の場合には、誘導性または

公正性真核細胞プロモーターの制御下で、1つまたはそれ以上の構造蛋白が発現される。それぞれの場合にレプリコンによるこれらの配列のカプシッド化を防止するために、構造蛋白遺伝子中に1つまたはそれ以上の存在する任意のパッケージング配列に特異的不活性化突然変異が作成される。これらの突然変異は通常、コードされるアミノ酸に影響を与えない、コドンの3番目の位置の沈黙（silent）の変化である。

多数の異種遺伝子をパッケージングする能力は多くの治療用途に使用されるであろう。これらには、多数のサイトカイン、多数のCTLエピトープ、免疫提示を増強するためのサイトカインCTLエピトープの組合せ、治療用蛋白の多数のサブユニット、治療用蛋白とアンチセンスRNAの組合せなどの発現があるが、これらに限定されない。多数の異種遺伝子が発現できる能力以外に、ウイルスへのサブゲノムmRNAのパッケージングは、このベクターが極端の長い異種配列を運搬することを可能にする（これは他のアルファウイルス系では不可能である）。さらに、この多くの部分に分かれたアプローチは、プロデューサー細胞株の開発に有用であり、これによりレプリカーゼ蛋白と構造蛋白が安定に発現され、サブゲノムベクター中に含まれる任意の遺伝子が安定な組み込み体として容易に導入される。

## シンドビスウイルスパッケージング細胞系統の構築

シンドビス遺伝子トランスファ系のもう1つの実施態様は、シンドビスパッケージング細胞系統の開発に関するものである。正常なシンドビス複製サイクルは完全に細胞質の中で起こることから、シンドビスパッケージング細胞系統系を作り出すための1つのアプローチは、この系をその天然の複製サイクルにならってモデリングす

ることにある。このアプローチを用いて、単数又は複数の安定した形で組込まれた発現ベクターからトランス形で供給されるウイルス構造タンパク質が細胞質内でトランスフェクション又はトランスダクションを受けたベクターRNAの写しを包膜することができるようにするシンドビスパッケージング細胞系統系が設計される。細胞の細胞質の中で複製することのできるシンドビスRNAベクター分子は、問題の遺伝子およびシンドビス非構造タンパク質(前述)をコードするcDNAベクタークローンをインビトロで転写するのに用いられるT7 RNAポリメラーゼ系によって最初に産生される。次にベクターRNAの写しはシンドビスパッケージング細胞系統へとトランスフェクションされ、かくしてベクターRNAは、高いレベルまで複製しその後ウイルス構造タンパク質によってパッケージングされて、感染性ベクター粒子を生成することになる。シンドビスcDNA分子の長さが延びていることから、インビトロ転写プロセスは効率的でない。さらに、単層内に含まれている細胞の1分画のみが大部分の手順によって標的にトランスフェクションされる。ベクター産生細胞系統の性能及び力価を最適化させようとして、遺伝子トランスファの2回の連続サイクルが行なわれる。生産者細胞系統内にシンドビスRNAベクター分子を直接トランスフェクションするよりもむしろ、まず最初にベクターを一次シンドビスパッケージング細胞系統内にトランスフェクションさせる。トランスフェクションを受けた細胞系統は、培養上清内に感染性ベクター粒子を分泌し、これらの感染性上清は次にシンドビスパッケージング細胞の新鮮な単層をトランスダクションするのに用いられる。パッケージング細胞系統内へのシンドビスベクターのトランスダクションは、細胞内へのRNAトランスファ効率がより高く細胞内でのベクターの生物学的位置が最適化されていることから、トラ

ンスフェクションよりも好ましい。こう

してパッケージングされた感染性の組換え型シンドビスベクターのより高い発現及びより高い力価が導かれることになる。

細胞系統がシンドビスベクター付着のための細胞レセプタを遮断する細胞外外被タンパク質を産生することから、産生されたシンドビスベクター粒子が同じパッケージング細胞系統をトランスダクションできない場合にはシンドビスパッケージング細胞をトランスダクションできる第2のタイプのシンドビスウイルス粒子を作り出さなくてはならない。この第2のタイプのウイルス粒子は、メインプロで転写されたシンドビスRNAベクターの写しのトランスフェクションを受けた結果として過渡的なベクター粒子を産生する。「ホッピング細胞系統」として知られているパッケージング細胞系統により産生されなくてはならない。ホッピング細胞系統は偽性型別 (pseudotyping) と呼ばれるプロセスの中で異なる細胞レセプタへとシンドビスベクターを再度導く代替的ウイルス外被タンパク質を提供することにより過渡的に産生されたベクター粒子のレセプター向性を再度導くように工学処理されている。現在、シンドビスベクター粒子の偽性型別のためには2つのアプローチが考案されている。第1のアプローチは、水疱性口内炎ウイルスGタンパク質(VSV-G)を同時発現するシンドビスパッケージング細胞系統から成る。我々の所では、VSV-G偽性型別は以前レトロウイルスベクターのレセプター向性を再度導くためにうまく機能し、多様な細胞タイプを感染させることが立証されてきた。偽性型別されたシンドビスベクター粒子を産生するための第2のアプローチは、レトロウイルスパッケージング配列を含むシンドビスRNAベクターをパッケージングすることができることになるレトロウイルスgag/pol及びenv配列を含む現在利用可能なレトロウイルスパッケージング細胞系統を使用することである。シンドビスウイルスの天然の複製サイクルにならってシ

ンドビスパッケージング細胞系統をモデリングすることによって、複製RNA分子から生成される翻訳に利用可能なRNA分子の数に基づいて高レベルの遺伝子発現を生み出す細胞系統が結果として得られるはずである。一方では、ポジティブ鎖の

RNAウイルスは、RNAベクターを変性してベクター粒子の全体的有効性を減少させる傾向をもつ可能性があり同様に長い培養期間中に高い発現レベルを低下させる可能性もある欠陥干渉性RNAを産生する傾向をもつ。従って、第1のアプローチの場合と同様に自己複製する能力を維持するシンドビスベクターRNA分子を産生するために、安定して組込まれたDNA発現ベクターが使用される第2のアプローチが考案された。このアプローチは、薬物選択標識を通して組込まれたDNAベクター発現系が維持され、DNA系が欠陥RNAコピーにより希釈し尽され得ない未変性RNAベクターを構成的に発現することになることから、長い培養期間にわたる連続的なベクター発現を可能にする。この生産者細胞形態では、サイズ制約条件によりトランスダクションのためのウイルスベクター粒子内への発現ベクターのパッケージングが妨げられる可能性があることから、DNAベースのシンドビスベクターは当初パッケージング細胞系統内へトランスフェクションによって導入される。同様に、この形態のためには、以前ベクターRNAを転写するのに使用されたプラスミドのT7 RNAポリメラーゼ認識部位は、使用される親細胞系統により規定されたもう1つの適当なプロモーター配列で置換される。このプラスミド配列は同様に、パッケージング細胞系統を作り出すのに使用されるものとは異なる選択標識を含むことになる。

或る一定のレベルでのシンドビスタンパク質及び／又はレプリコンRNAの発現は、パッケージング細胞系統内の細胞障害効果という結果をもたらす可能性がある。従って、場合によっては、細胞が或

る一定の臨界的密度まで増殖してしまった後で初めてこれらの要素を発現させるのが望ましい可能性もある。この目的のため、RNAベクター自体又はその他のいくつかの刺激による誘発の後にのみパッケージングに必要な構造タンパク質が合成されるようにする付加的な修正が加えられる。同様に、いくつかの修正は、これらのタンパク質をコードする遺伝子のリンケージを解除する発現ベクターを利用することによって、別々の誘発可能な要素の制御下でこれらのタンパク質の個々の発現を可能にする。その上、組込まれたベクター分子自体の発現は、さらにもう1つの誘発可能な系によって制御され得る。この形態は結果として誘発に続

く一連の段階的事象がもたらされ、こうして究極的に、パッケージングされたベクター粒子の産生が導かれることになる。

#### A. シンドビスパッケージング細胞系統の開発のための親細胞系統の選択

##### 1. 持続的に又は慢性的に感染可能な細胞

シンドビスパッケージング細胞系統を作り出すべく潜在的親細胞系統を選択するための1つの重要な基準は、シンドビスベクターの複製及び産生中に溶解されない細胞系統の選択である。この基準は、長期間にわたって増殖させ安定したベクター供給源として使用することのできるシンドビスベクター生産者細胞系統の開発にとって必要不可欠のものである。大部分の哺乳動物細胞のシンドビス感染が結果として細胞溶解をもたらすことがわがっている。しかしながらさまざまな昆虫細胞系統の利用によってこの問題を回避できるはずである。一例としては、シンドビスウイルスによるセスジャブカ (*Aedes albopictus*) 細胞の感染は、感染した細胞が生存可能な状態にとどまり連続的にウイルスを放出する、持続性の又は慢性の非細胞変性ウイルスの成長という結果をもたらす。*Aedes aegypti*, *S. podoptera frugiperda*, 及び *Drosophila melanogaster* 細胞系統といったその他の昆虫細胞系統も同じ持続性の感染を示すはずである。従って第1のシンドビスパッケージング細胞系統の形態は、これらの細胞タイプの中で有効な誘発可能な又は誘発不可能なプロモーターの制御下でシンドビス構造タンパク質を発現する安定した形でトランスフェクションを受けた発現ベクターを含み、選択可能な標識を同時発現する *Aedes albopictus* 又は *Drosophila* 細胞系統といった昆虫親細胞系統を使用する。

最近、感染した *Aedes albopictus* 細胞の中でのシンドビスウイルスの産生のダウンレギュレーションに結びつけられた細胞由来のシンドビスウイルス誘発タンパク質が同定され精製された (*Virology* (ウイルス学) 194: 44)。このタンパク質は、抗ウイルス状態を誘発し49S及び26Sの両方のウイルスRNA合成を阻害することのできる、約3200Daの小さい疎水性ペプチドである。抗ウイルス性ペプチドで処理された細胞は、通常、未感染細胞内で96時間細胞分裂の静止性停止を示し、その後正常な成長速度を回復する。感染に先立ってこのペプチドにさらされ

た細胞は、シンドビスウイルスを複製することができず、10ヵ月の連続継代を通して抗ウイルス性タンパク質を構成的に産生することによってこの表現型を維持するように思われる。

Aedes albopictus細胞内でのシンドビス感染に対するこの細胞応答が組換え型シンドビスベクター産生系の最適な効率を減少させる可能性があるということが認められている。シンドビスベクター産生の効率を改善するため、ウイルス誘発された細胞抗ウイルス性タンパク質を不活性化させてベクター粒子の力価の減少をことごとく防止する2つの方法が考案された。第1の方法は、上述のこの細胞タンパク質の精製及び、当該技術分野において既知の立証済み技術

を用いた、一次アミノ酸配列の一部のそのカルボキシ末端からの決定を内含するものである。結果として得られたアミノ酸配列はその後、考えられる対応するゲノミック配列を誘導するのに用いられ、かくして特定の細胞配列を増幅するのに使用できる縮重PCRプライマー対を設計することができるようになる。このときこの増幅した配列は、この阻害タンパク質をコードする遺伝子の孤立性領域を得るため、当該技術分野において知られている標準的な技術を用いてクローニングされる。このクローンのヌクレオチド配列の決定によって、次に相同な組換えによってこのシンドビス阻害遺伝子内に特異的に組込まれ機能的タンパク質を発現するその能力を「ノックアウトする」ことになる1つのベクターを設計することが可能になる。ノックアウト配列を含むクローンは、ベクターで細胞をトランスフェクションする前に、阻害タンパク質の孤立性のクローニングされた領域内へ選択可能な標識を挿入することによって選択できる。

このシンドビスウイルス阻害タンパク質を不能にするための第2の方法には、例えばBUDR（5-ブロモデオキシウリジン）でのAedes albopictus細胞の突然変異誘発が関与する。この突然変異誘発されたパッケージング細胞系統集団は次に、ネオマイシン耐性標識を発現できるシンドビスベクターでの感染を受ける。高濃度のG418薬物の下で、大量のシンドビスベクターを再生する、ひいてはシンドビス阻害遺伝子を発現することができない細胞のみが存続することになる。選択の後、耐性コロニーはプールされ、希釈クローニングされ、高力価のシンドビ

ス産生についてテストされる。

## 2. シンドビス発現に対する感受性を減小させるための細胞の修正：アポプトーシスの抑制

大部分の哺乳動物細胞系統は、シンドビスウイルス感染の間に溶解させられるが、最近の実験では、ラット前立腺ガン(AT-3)細胞

細胞系統内での溶解シンドビス感染から持続性シンドビス感染への変換が実証された。この変換は、シンドビス感染に先立って細胞系統内でbcl-2オンコ遺伝子産物を構成的に発現することによって行なわれた。bcl-2オンコ遺伝子を発現するAT-3細胞のシンドビス感染は、明白な細胞病理無しでウイルスの産生を結果としてもたらす(Nature, 361: 739)。この細胞系統の修正は、マウス細胞系統D-17及びCf2; ヒト細胞系統HT1080及び293; ウズラ細胞系統AT-6; ペビーハムスター腎細胞系統BHK-21; マウス神経芽細胞腫細胞系統N18; 及びラット前立腺ガンAT-3といった細胞系統を、レトロベクター産生系統のものと同様の潜在的シンドビスパッケージング及び生産者細胞系統として使用するための持続的に感染可能な状態へと変換するのに有効であることが立証できた。

bcl-2オンコ遺伝子レトロウイルス発現ベクターは、以前にも記述されてきた(Nature, 361: 739)。新しいbcl-2発現ベクターは、プラスミドp84(Nature 361: 259)から誘導された910塩基対のEcoR I cDNAフラグメントを、構成性プロモーターを含み選択可能な標識をコードする市販のあらゆる発現ベクターの中に挿入するべく当該技術分野において既知の標準的組換え型DNA技術を使用することによって構築される。シンドビス核酸配列とその他のトランスダクションを受けたベクターの間のあらゆるタイプの相同性を回避するよう、入念に考慮しなければならない。この予防措置は、組換え型シンドビス粒子内の選択可能な標識又はbcl-2オンコ遺伝子の望ましくないパッケージングを導く可能性のある組換え事象を防ぐために構じられるべきものである。本書に記述するシンドビスベクター系は生物学療法として使用するよう設計されていることから、これは重要な指摘点である。ひとたびbcl-2発現ベクターが構築されると、哺乳動物の親細胞系統(すなわちBHK-21細胞)はあらゆる



標準技術を用いてトランスフェクションされ、適切な標識について選択される。

次に耐性コロニーはプールされ、その後希釈クローニングを受ける。個々のコロニーはその後増殖され、*bcl-2*発現についてスクリーニングを受ける。発現がひとたび確認されると、持続性シンドビス感染がテストされ、その後シンドビスパッケージング細胞系統の開発のための親細胞系統として用いられる。

BHK細胞のシンドビス感染は、形態的变化及びアポトーシス（細胞自滅）のDNA断片化パターン診断という結果をもたらし、*bcl-2*オンコ遺伝子による溶解性から持続性感染への交換は、このプログラミングされた細胞死滅の抑制によって媒介されうる (Nature 361 : 739)。さらに、アデノウイルス、ポリオマウイルス、SV40、及びHIVを含むその他のウイルスでの哺乳動物細胞の感染は、アポトーシスによる細胞障害性という結果をもたらした。従って、シンドビスパッケージング又は生産者細胞系統内での発現のためには、アポトーシスを抑制するその他の遺伝子産物が、*bcl-2*オンコ遺伝子に加えて望ましいものである。当初、アポトーシスを抑制することが示された3つのウイルス遺伝子が、シンドビスパッケージング細胞系統内で発現されることになる。すなわち、19-kDタンパク質をコードするアデノウイルスE1B遺伝子 (Ras et al., PNAS 89 : 7742~7746, 1992)、I型単純ヘルペスウイルスgI34.5遺伝子Chou及びRoizman (PNAS 89 : 3266-3270, 1992) 及びAcMNPVバキュロウイルスp35遺伝子 (Clem et al., Science 254 : 1388-1390, 1991) である。個々の遺伝子は、当該技術分野において既知の標準技術を用いて、選択可能な標識を含み構成性真核性転写プロモーターの制御下にあるプラスミド発現ベクター内に挿入される。これらの発現ベクターはその後、前述のとおり細胞系統内にトランスフェクションされ、適当な選択が適用される。これらの遺伝子の安

定した組込み及びその産物の構成性発現についての選択により、シンドビスで誘発されたアポトーシス事象に対し感受性をもつものとして知られている細胞系統内でのより拡大したベクター産生が可能となるはずである。その上、各々の遺伝子産物がそれ自身の独自のメカニズムによりアポトーシスを阻害できるようにすることも実現可能である。従って、遺伝子も、より強い抑制効果を得るため

さまざまな組合せでパッケージング細胞系統内に導入されることになるだろう。最後に、アポトーシスに対して類似の効果をもつその他の遺伝子産物を、それが発見されるにつれてパッケージング細胞系統の中に容易に取り込むことが可能である。

シンドビスベクター生産者細胞系統の誘導において、ベクター及びベクターパッケージングカセットの両方で安定した形で形質転換された生産者細胞系統を誘導させることができるように、ウイルス遺伝子の発現を抑制するための数多くのアプローチが提案されている。これらのアプローチには、誘発可能な及び／又は分化感応性プロモーター、アンチセンス構造遺伝子、非相同制御系及び蚊、そして持続性ウイルス感染が樹立されているその他の細胞が含まれる。シンドビスベクター生産者細胞系統の最終的形態がいかなるものであれ、持続性感染の樹立又は少なくともウイルス遺伝子発現の結果としての細胞死滅の遅れがアポトーシスを阻害することによって増強されることになるということは明白であると思われる。アデノウイルス、HPV、SV40及びマウスポリオーマウイルス (Py) を含むDNA腫瘍ウイルスは、一部には、網膜芽細胞 (Rb) 遺伝子産物p105及びその密に関係する遺伝子産物p107及びサイクリンA、p33<sup>cdk2</sup> 及びp34<sup>cdk2</sup> を含む細胞サイクルの制御に関与するその他の遺伝子産物に対する結合及びそれらの不活性化によって、細胞を形質転換させる。Pyを除いてこれらのウイルスは全て、p53に結合し、それによってp53の機能を抑制する。

これらのウイルスは、p53の機能を抑制する遺伝子産物をコードする。唯一Pyだけは、膜チロシンキナーゼsrc及びこのウイルスの完全な形質転換ポテンシャルのために必要とされるホスファチジルイノシトール-3-キナーゼに結合しこれを活性化する中間T抗原 (mT) をコードする (Talmage et al., Cell 59:55~65, 1989)。Rb及びp53劣性オンコ遺伝子産物に対する結合及びその不活性化はこれらのDNA腫瘍ウイルスにより形質転換された細胞がアポトーシス経路に入るのを防ぐ。p53は、一部には、C-fos, hsc70及びbcl-2を含む細胞増殖と結びつけられたタンパク質の発現を抑制することによって、細胞分裂を停止させることができるということが知られている (Miyashita et al., Cancer Research 54:3131~3135, 1994)。

シンドビスウイルスの産生の期間を延長するため、又は可能であれば持続性シンドビス感染を促進するため、パッケージング細胞はpy又はSV40からのウイルス性ゲノミックDNAを用いて形質転換される。マウス及び霊長類のDNA腫瘍ウイルスPy及びSV40がそれぞれ、天然宿主以外の種からの細胞内で容易に安定した形質転換を樹立するということは周知のことである。このような非許容的細胞、例えばハムスターから誘導された非許容的細胞においては、これらのウイルスは複製できず、ウイルスの早期領域発現依存性（例えばT抗原）組込みという結果をもたらす（Bevjamin及びVögt, Fields Virology 第1巻、第19章参照）。SV40及びPy T抗原はこれらの形質転換されたハムスター細胞内で構成的に発現される。

SV40及びPyの形質転換された細胞系統が樹立され、ウイルス感染後の動態及びシンドビス産生レベル及び細胞病理学が見極められる。ハムスター細胞内のシンドビス増殖の特徴であるアポトーシス事象が低減されたならば、各々のプロトタイプシンドビスパッケージング細胞系統は、これらの細胞からのパッケージングされたベクター

の感染に用いられる。

ターの収量を増大させるためPy又はSV40で形質転換される。

### 3. シンドビス発現に対する感受性を減少させるための細胞の修正：活成化依存性ベクター粒子の産生

前駆物質PE2としてシンドビスE2糖タンパク質を合成させる。このPE2前駆物質及び第2のウイルス糖タンパク質E1は、小胞体の中で結びつき、処理され、ピリオン取込みのためのヘテロダイマーとして、感染した細胞膜まで輸送される。この処理中の或る点で、PE2はE3と成熟E2に分割される。E3は、PE2の64アミノ末端残基であり、成熟中細胞外空隙の中で喪失する。さらに大きい分割産物E2は、E1と結びつき、ウイルスエンベロープとなるものの中に固定される。保存度の高い正準4アミノ酸(aa)残基モチーフ、basic-X-basic-basic aa'sのすぐ後に続く部位において分割するPE2前駆物質の処理を担当するのは、宿主細胞のプロテアーゼである。RPE.40と呼ばれるCHO-K1菌株から誘導された突然変異細胞系統(Watson et al., (1991) J. Virol. 65: 2332-2339)は、PE2前駆物質をE3及びE2形に処理する能力がないことから、シンドビスウイルス菌株AR339の産生におい

て不完全である。従って、RPE.40細胞系統の中で産生されるシンドビスビリオンのエンベロープは、PE2/E1ヘテロダイマーを含んでいる。RPE.40細胞は、親CHO-K1細胞よりもシンドビスウイルス感染に対して少なくとも100倍の耐性をもち、このことはすなわち、ビリオンを含むPE2の細胞を感染させる能力が非効率的であることを示唆している。RPE.40により産生されたこれらの欠陥ビリオンは、トリプシンでの処理によって完全に感染性の形に変換されうる。

パッケージング及び生産者細胞系統の中では、組換えにより産生されたあらゆる野生型ウイルスが細胞を再感染させ、迅速に増幅されることになり、かくしてパッケージングされたベクター調製物を

著しく汚染する。RPE.40系統から開発された生産者細胞は、ベクターの産生及びパッケージング中に生成されたあらゆる野生型ウイルスの効率の低い増幅のため、シンドビスウイルス感染に対し許容的なその他の系統に比べ著しい改善となるだろう。かくして、ベクター調製物は、野生型ウイルスによる著しい汚染を受けない。その上、この系は、類似の細胞プロテアーゼ内で「ノックアウト」突然変異体を開発することによってその他の細胞系統にも拡大できる。

#### 4. ホッピング細胞系統の開発

前述のようなシンドビスホッピング細胞系統は、異なる細胞レセプタ向性について偽性型別された感染性RNAベクター粒子を過渡的に産生するために用いられる。ホッピング細胞系統がベクター粒子をひとたび産生すると、それはもはや必要でなくなる。というのも、上述のものとシンドビスパッケージング細胞系統をトランスダクションするには、感染性培養上清しか必要でないからである。従って、ベクター粒子を過渡的に産生するためには、ホッピング細胞系統がシンドビスによる持続性感染を示す必要はない。この場合、親細胞は、持続性感染を示す昆虫細胞系統であってもよいし、或いは生産的シンドビス感染の後72時間以内に溶解する可能性の高い哺乳動物細胞系統であってもよい。唯一の基準は、その細胞系統が、シンドビスRNAベクターでのトランスフェクションに先立って細胞の成長に影響を及ぼすことなくVSV-Gタンパク質又はレトロウイルスgag/pol及びenvタンパク質のいずれかを同時発現しながら、シンドビス構造タンパク質を発

現し処理することができるということである。従って、シンドビスホッピング細胞系統は、bcl-2 オンコ遺伝子発現といったような前述のような付加的な細胞の修正無くシンドビス又はレトロウイルスのいずれかの複製を支持することのできる上述の親細胞系統のいずれかであってよい。

VSV-G偽性型別されたシンドビスベクターを作り上げるためには、シンドビスパッケージング細胞系統内にVSV-G外被タンパク質を発現するベクターPMLP-Gと共にインビトロで転写されたシンドビスベクターRNA又はDNAの同時トランスフェクションが必要とされる。細胞成長条件及びトランスフェクション手順については、「構成要素のアッセムブリー」という見出しの下で記述されており、記述されているパッケージング細胞形態のいずれでも使用される。トランスフェクションから24時間後に、VSV-G偽性型別シンドビスベクターを含む上清を収穫し、次にこれを用いて、トランスダクション効率の低下を克服するべく同一のシンドビスパッケージング細胞系統の新鮮な単層をトランスダクションする。

レトロウイルスパッケージング細胞系統の中でのシンドビスベクターの偽性型別のためには、レトロウイルスパッケージング配列を含むべく工学処理されたシンドビスRNAベクターをパッケージングするのに、レトロウイルスgag-pol及びenv配列を発現する文献内に参照指示されているあらゆる細胞系統を使用することができる。サブゲノミックRNAではなくゲノミック長のベクターのみがレトロウイルス外被タンパク質によってパッケージングされるように、レトロウイルスpsiパッケージング配列は、不活性化された接合領域と合成接合領域縦列反復の間に挿入される。シンドビスベクターRNAを含むレトロウイルス粒子は、前述した手順を用いて、インビトロ転写されたシンドビスベクターRNAをトランスフェクションすることによって産生される。シンドビスRNAベクターを含む偽性型別レトロウイルス粒子を伴う上清を、トランスフェクションから24時間後に収穫し、これらの上清は次にシンドビスパッケージング細胞系統のトランスダクションに使用することができる。

#### B. 構造タンパク質発現構成体

### 1. 誘発可能な構成性構造タンパク質ベクター構成体

シンドビスパッケージング細胞系統の開発は、必要な構造タンパク質すなわちカプシド、E2及びE1の高い細胞間レベルを合成する能力に依存している。残念なことに、これらのタンパク質時に外被糖タンパク質E2及びE1の高レベル発現は、それに付随する細胞病理及び偶発的細胞死滅を導く可能性がある。従って、構造タンパク質発現カセットは、構成性発現レベルを維持するその他のものに加えて遺伝子発現のレベルを制御する誘発可能な調節要素を伴って設計されてきた。

第1の形態においては、シンドビス構造タンパク質の発現は、誘発可能なlacオペロン配列と組合わせた状態でRSV LTRの制御下にある。これはpOP13及びpOPRSV1ベクター (Stratagene) 内へのウイルス構造タンパク質遺伝子に対するシンドビスcDNAの挿入により達成される。別々に使用されるこれらのベクターは、lacリプレッサー「i」タンパク質を発現するp3' SSベクター (Stratagene) を用いて同時トランスフェクションされる。例えば、イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) といった誘発物質が無い場合、ルシフェラーゼリポーター遺伝子の基礎的又は構成性発現レベルは、細胞1つにつき10~20コピーであると報告されてきた。IPTGの付加は、リプレッサータンパク質のコンホメーション変化という結果をもたらし、こうしてlac-オペレーター配列に対するlacタンパク質の親和力は減少し、非相同遺伝子の高レベル発現を可能にする。95倍というIPTGの存在下での誘発レベルが、pOP13ベクター内に含まれている非相同遺伝子に対して報告された。

特定の言うと、シンドビス構造タンパク質遺伝子 (SP) cDNAは、以下の通りpOP13及びpOPRSV1ベクター内に挿入される。SPコーディング領域は、シンドビス nt 7638での効率のよい翻訳開始のた

めのKozakコンセンサス配列に対応する周囲のヌクレオチドを含め、真正のAUG翻訳開始部位及びUGA翻訳停止部位に対してそれぞれマッピングする5'末端をもつプライマー対と共に全体として増幅される。順方向プライマーは、シンドビス nts 7638~7661に対し相補的であり、逆方向プライマーはシンドビス nts 11,384~11,364に対して相補的である。構造タンパク質遺伝子に対応するシンドビスcd

NAのPCR増幅は、以下のオリゴヌクレオチド対を用いて、標準的2温度循環プロトコルによって達成される。

順方向プライマー (7638F) :

5' -TATATGCGGCCGCACCACCACCATGAATAGAGGATTCTTTAACATGC- 3'

(配列培養38)

逆方向プライマー (1138R) :

5' -TATATGCGGCCGCTCATCTTCGTGTGCTAGTCAG- 3'

(配列培養39)

指示されたシンドビスntsに対するそのそれぞれの相補性に加えて、5ヌクレオチド「バッファ配列」とそれに続くNot I 認識配列が、各プライマーの5' 末端に付着されている。PCR増幅の後、1%のアガロースゲル中で3763bpのフラグメントが精製され、次にNot I 酵素でひきつづき消化される。その後、結果として得られた3749bpのフラグメントは別々にpOP13及びpOPRSV1ベクターへと連結され、これらのベクターはNot I で消化され、仔ウシ腸内アルカリ性ホスファターゼで処理される。シンドビス構造タンパク質のコーディングキャパシティ全体を含むこれらの発現カセットベクターは、pOP13-SINSP及びpOPRSV1-SINSPとして知られている。

lacオペロン-シンドビス構造タンパク質遺伝子発現カセットの変形態様と、その他のウイルス、細胞又は昆虫ベースのプロモーターを用いて構築することもできる。当該技術分野において知られて

いる一般的な分子生物学技術を用いて、lacオペロン及びRSV LTRプロモーター又は単にRSV LTRプロモーターのみの配列をStratagene pOP13及びpOPRSV1ベクターからスイッチし、サイトメガロウイルス主要即時プロモーター (pOPCMV-SINSP) ; アデノウイルス主要後期プロモーター (pOPMLP-SINSP) 又は; Drosophilaメタロチオネイン誘発性プロモーター (pMET-SINSP) 、Drosophilaアクチン5C遠位プロモーター (pOPA5C-SINSP) 、熱衝撃プロモーターHSP65又はHSP70 (pHSP-SINSP) 又はバキュロウイルスポリヘドリンプロモーター (pPHED-SINSP) といったその他のプロモーター配列により置換させることができる。

## 2. タンパク質発現レベルを増大させるためのカセットの修正

mRNA写しのレベルが増大した場合、シンドビス構造タンパク質の発現を増大させることができる。mRNA写しのレベルの増大は、シンドビス非構造タンパク質がこれらの写しを認識し、その代りにメッセージをより高いレベルまで複製するような形で、発現カセットを修正することによって達成されうる。この修正は、翻訳のための第1の真正なATG部位と発現カセットのプロモーター配列の間にて、シンドビス構造タンパク質コーディング領域の極端の5'末端に対して野生型最小接合領域コア（ヌクレオチド7579～7602）を付加することによって行なわれる。このことはシンドビス構造タンパク質cDNAをpOP13及びpOPRSV1発現ベクターの中に入れるため以上で記述したものと同一PCR増幅技術に従うことで達成できる。この手順に対する唯一の修正は、以下のとおりのコーディング領域の第1のATGとNot I 制限酵素部位の間に接合領域コアヌクレオチド7579～7602を含む類似のプライマーでの7638Fの順方向プライマーの置換である：

順方向プライマー（JUN 7638F）：

5'-TATATGCGGCCGCATCTCTACGGTGGTCCTAAATAGTACCACCACC-  
ATGAATAGAGGATTC-3'（配列番号40）。

PCR増幅に続いて、1%のアガロースゲルの中で、結果として得られた3787bpフラグメントを精製させ、次にNot I 酵素でひきつづき消化させる。その後、結果として得た3773bpのフラグメントを別々にpOP13及びpOPRSV1ベクターへと連結させ、これらのベクターはNot I で消化され、仔ウシ腸内アルカリ性ホスファターゼで処理させる。結果として得られた発現カセットベクターは、pOP13-JUNSINSP及びpOPRSV1-JUNSINSPとして知られている。しかしながら、構造タンパク質発現カセット内への接合領域配列の導入は、野生型シンドビスウイルスの生成を導く望ましくない組換え事象をもたらす可能性のある配列を導入することになる、ということに留意すべきである。

## 3. シンドビスベクターを介しての構造タンパク質の誘発可能な発現

構造タンパク質の発現からの潜在的な細胞障害効果のため、これらのタンパク質の適度の基礎レベルさえ発現する誘発可能なパッケージング細胞系統の樹立は



、最良の方法ではない場合もある。従って、シンドビスベクターによりトランス形で供給された非構造タンパク質を介しての高レベルの構造タンパク質合成誘発のための調節要素を含むものの適切に刺激を受けるまでは基礎的合成レベルを全くもたないパッケージング細胞系統発現カセットが構築される。

この形態においては、隣接するシンドビス接合領域配列から構造タンパク質遺伝子の転写が起こるようにする構造タンパク質遺伝子カセットが構築される。このカセットの一次的特徴は、転写開始が真正のシンドビスヌクレオチド1で始まるような、シンドビスヌクレオチド1に直接隣接して位置づけされているRNAポリメラーゼII

プロモーター、トランスクリプターゼ（転写酵素）認識のために必要とされる5'末端シンドビス配列、構造タンパク質遺伝子mRNAの発現のためのシンドビス接合領域配列、シンドビス構造タンパク質遺伝子配列、複製のために必要とされる3'末端シンドビス配列及び転写終結／ポリアデニル化配列である。構造タンパク質遺伝子のAUG開始部位に先立つ翻訳終結コドンで終る上流読取り枠のため、シンドビス構造タンパク質の発現は、ベクター供給された非構造タンパク質によるマイナス鎖RNAの合成とその後の接合領域からの構造タンパク質遺伝子mRNAの転写の後にのみ起こりうる。従って、この系の誘発可能性は、インビトロ転写されたRNA又は適切なプロモーター要素の下流に位置づけされたcDNAのいずれかとして導入される、シンドビスベクター自体によって供給される非構造タンパク質の存在に完全に依存している。さらに、5'末端及び3'末端のシンドビス配列は、構造タンパク質遺伝子カセットのこのRNA写しと同じベクター供給された非構造タンパク質によって増幅されることを可能にする（図8参照）。

特定の言うと、ポジティブセンスのベクター誘発可能なパッケージングカセットの構築は以下の通りに達成される。前述のpVGELVISベクターは、非構造遺伝子コーディング配列の大部分を含むヌクレオチド422～7054を除去するべく酵素BspE Iで消化され、残りの9925bpフラグメントは0.8%のアガロースゲル内で精製され、その後自らに再連結されてpLTR/SindI BspEとして知られている構成体を生成する。この欠失は、nts 60-62にある5'末端真正翻訳開始コドンが無傷の

ままに残し、それぞれnts. 7130～7132及び7190～7192（当初の番号付け）において枠内下流UAA及びUGA停止コドンを作り出し、かくして下流構造タンパク質遺伝子読み取り枠の翻訳を防いでいる。pLTR/SinI BspEパッケージングカセット構成体はひ

き続きBHK細胞（ATCC #CLL 10）内にトランスフェクションされ、前述の通り400  $\mu$ g/mlにてG418薬物を用いて、陽性トランスフェクションが選択される。図4に示したデータにより、これらのLTR/SinI BspEパッケージング細胞内へのSin-lucベクターRNAのトランスフェクションは、回収された上清がSin-lucベクターRNAをBHK細胞の新鮮な単層までトランスファするものであることが示されていることから、Sin-luc RNAを含む感染性シンドビス粒子の産生という結果をもたらす、ということが実証されている。

BspE I 欠失を作り出すための初期材料としてPVG-ELVISdクローン（前述のもの）を用いて、類似のパッケージング構成体も作られる。このクローン内では、シンドビス3'末端配列の後には、シンドビスの3'末端配列に隣接する一次写しのより精確な処理を可能にするべく、触媒リボザイム配列が続いている。さらに、これらのパッケージングカセット構成の変形態様を、現行のMuL VLTRに対するその他のRNAポリメラーゼプロモーターの置換、RNAポリメラーゼプロモーターと第1のシンドビスヌクレオチドの間の単数又は複数のヌクレオチドの付加、又はトランスクリプターゼ認識に必要とされる5'末端シンドビス配列を保持する又は保持し得ない、構造タンパク質配列の上流でのシンドビスコーディングを受けていない読み取り枠の置換を含む、当該技術分野における標準的技術を用いて作ることも可能である。

もう1つのベクター誘発可能なパッケージング形態においては、発現カセットは、その天然の接合及び3'末端翻訳領域によってフランキングされ、プロモーターからの一次転写がアンチセンス構造タンパク質遺伝子及び分子を産生するように1つの配向で発現ベクター内に挿入されたシンドビス挿入タンパク質遺伝子配列のcDNAコピーを含んでいる。付加的には、これらの構成体は同様に接合領域

に隣接して、ウイルストランスクリプターゼによる認識にとって必要なシンドビス5'末端配列及び5'末端配列のシンドビスヌクレオチド1に直ぐ隣接して位置づけされた触媒リボザイム配列をも含んでいる。このため、このリボザイムは第1のシンドビスヌクレオチドの後で精確に一次RNA写しを分割する。このアンチセンス配向においては、構造タンパク質遺伝子は翻訳され得ず、その発現に先立つポジティブ鎖のmRNA内への転写のために、シンドビスウイルス非構造タンパク質の存在に完全に依存している。これらの非構造タンパク質は、シンドビスベクター自体により提供される。その上、この形態では精確なシンドビスゲノム5'-及び3'-末端配列が含まれていることから、構造タンパク質遺伝子の写しは、シンドビスベクターにより提供されたものと同じ非構造タンパク質を利用することによって、増幅を受ける。

特定のには、シンドビス構造タンパク質遺伝子cDNAはゲノミッククローンpVGS-p6GENから取出され、以下のとおり、pcDNA3 (Invitrogen Corp., San Diego, CA) 発現ベクター内に挿入される。第1にプラスミドpVGS-p6GENは、非構造タンパク質1, 2, 3及び大部分の4をコードする遺伝子を含むヌクレオチド7335までの全てのシンドビス配列を除去するべく酵素Apa I 及びBamH I で消化される。シンドビス構造タンパク質遺伝子を含む残りの7285bpのベクターフラグメントを、0.8%のアガロースゲル内で精製し、その後、2つの合成オリゴヌクレオチドをアニールすることによって得られるSinMCSと呼ばれるポリリンカー配列と連結させる。オリゴヌクレオチドSinMCS I 及びSinMCS IIは、Cla I, Bgl II及びSpe I についての認識部位を含み、アニリングの後、Apa I 及びBamH I 末端を有する。その配列は以下のとおりである。

SinMCS I :

5'-CTCATCGATCAGATCTGACTAGTTG-3' (配列番号31)

SinMCS II :

5'-GATCCAAGTAGTCAGATCTGATCCATGAGGGCC-3' (配列番号32)

このとき、pMCS-26Sとして知られている結果として得られた構成体は、重複PCR増幅を用いて肝炎デルタウイルス (HDV) の抗ゲノミック鎖からの84ヌクレオチ

ドリボザイム配列に融合されたシンドビスの5'-末端の299のヌクレオチドを含むように修正される (Nature 350:434)。2つのプライマー対は当初別々の反応において使用され、その後2回目のPCRにおいて、その重複合成が行なわれる。反応#1では、順方向プライマー (HDV49-XC) はHDVゲノムヌクレオチド823-859に対して相補的であり、逆方向プライマー (HDV17-68) はHDVゲノムヌクレオチド839-887に対して相補的であり、配列は以下の通りである：

順方向プライマー (HDV49-XC)

5'-ACTTATCGATGGTTCTAGACTCGCTTAGCCATCCGAGTGGACGTG-  
CCGTCCTCCTTC-3' (配列番号33)

逆方向プライマー (HDV17-68)

5'-TCCACCTCCTCGCGGTCCGACCTGGGCATCCGAAGGAGGACGCAC-  
GTCCACT-3' (配列番号34)

そのそれぞれの相補性に加えて、プライマーHDV49-XCは、5'-末端にフランキングXba I 及びCla I 認識配列を含んでいる。HDV配列のPCR増幅は、これらのプライマー及びVentポリメラーゼでの標準的2温度循環プロトコルによって達成される。反応#2では、精確にHDV及びシンドビス配列を接合する順方向プライマー (SIN-HDV) はシンドビスのヌクレオチド1-21及びHDVのゲノミックヌクレオチド871-903に対し相補的であり、20のヌクレオチド分だけプライマーHDV17-68 (以上から) の配列と重複し、逆方向プライマ

ー (SIN276-SPE) はシンドビスヌクレオチド299-276に対し相補的であり、配列は以下の通りである。

順方向プライマー (SIN-HDV)

5'-TCGGACCGCGAGGAGGTGGAGATGCCATGCCGACCCATTGACGGC-  
GTAGTACACACT-3' (配列番号35)

逆方向プライマー (SIN276-SPE)

5'-CTGGACTAGTTAATACTGGTGCTCGGAAAACATTCT-3' (配列番号36)

そのそれぞれの相補性に加えて、プライマーSIN276-SPEは、その5'-末端に、フランキングするUAA翻訳終了コドン及びSpe I 認識配列を含んでいる。HDVリ

ボザイム配列に融合されたシンドビス5'-末端配列を含むフラグメントのPCR増幅は、鋳型としてのpVGS、p6GENプラスミド、これらのプライマー及びVentポリメラーゼを用いて、標準的な2温度循環プロトコルにより達成される。一回目のPCR増幅の後、反応#1及び反応#2の各々からの合計量の1/20を組合わせ、付加的にプライマーHDV49-XC及びSIN276-SPEを投与し標準的な2温度循環プロトコルを用いた2回目のPCR増幅において、鋳型としてこれを使用する。2回目のPCRの後、414bpのアンプリコンをMermaidキット (BioLol, La Jolla, CA) で精製し、酵素Cla I及びSpe Iで消化させる。消化したアンプリコンを1%のアガロースゲル内で精製し、その後プラスミドpMCS-26sへと連結させるが、このプラスミドと同様にCla I及びSpe Iで消化させられ1%のアガロースゲル中で精製される。結果として得られる、発現カセット要素HDV抗ゲノミックリボザイム/シンドビス5'-末端299 nts./シンドビス接合領域/シンドビス構造タンパク質遺伝子/シンドビス3'-末端未翻訳領域を含む構成体は、p $\delta$ 5'26sとして知られている。

p $\delta$ 5'26sからpcDNA3ベクター内への構造タンパク質遺伝子カセットの挿入

このカセットの挿入は、以下の通りに行なわれる。プラスミドp $\delta$ 5'26は酵素Xba Iで消化され、3'-陥凹末端は、クレノウ酵素及びdNTPの付加により平滑末端にされる。4798bpの構造タンパク質遺伝子カセット全体を1%のアガロースゲル中で精製する。プラスミドpcDNA3と酵素Hind III及びApa Iで消化させ、T4 DNAポリメラーゼ酵素及びdNTPを付加することによって末端を平滑にし、1%のアガロースゲル中で5342bpのベクターを精製する。その後、精製された2つの平滑末端DNAフラグメントを連結させ、結果として得た構造タンパク質遺伝子発現カセットベクターは、pCMV- $\delta$ 5'26として知られている(図8参照)。細胞内へのこのDNAのトランスフェクション及びG418耐性についての選択は、前述のとおりに行なわれる。

cMVプロモーター/アンチセンス-シンドビス構造タンパク質ベクターの修正態様を、その他のウイルス、細胞又は昆虫ベースのプロモーターを用いて構築することも可能である。当該技術分野において知られている一般的分子生物学的技

術を用いて、CMVプロモーターをインビトロゲンpcDNA3ベクターからスイッチし、以前に列挙したもののようなプロモーターにより置換させることができる。このアンチセンスパッケージングカセットのその他の変形態様としては、第1のシンドビスヌクレオチドと触媒リボザイムの間の単数又は複数のヌクレオチドの付加、写しの処理のためのその他の触媒リボザイム配列の使用、触媒リボザイム配列のための精確な転写終了シグナルの置換又は、構造タンパク質第1 mRNAの転写を結果としてもたらすRNAポリメラーゼによって認識されるあらゆる下流配列を用いた構造タンパク質遺伝子カセットのアンチセンス発現、があるが、これらに制限されるわけではない。

さらに、記述されたベクター誘発可能な構成体の各々がシンドビスベクター自体に対し相同な配列を含んでいるということに留意す

べきである。従って、2つのRNA分子の間の組換えによる野生型ウイルスの生成の潜在性が存在する。以下で記述する通り、この可能性を無くするべく付加的な修正が加えられる。

#### 4. 組換えを防ぐための構造タンパク質遺伝子の分離

ここで記述するアプローチの有用性を実証した後、これらの原理に基づいて、付加的なパッケージング細胞系統を生成する。これらの付加的な系統は、構造タンパク質遺伝子の組込み及び発現を分離し、重複しない独立したRNA分子としてのそれらの転写を可能にする。糖タンパク質E2及びE1とは独立したカプシドタンパク質の発現、又は3つのタンパク質の各々の互いから独立した発現は、ベクターRNAとの組換えそしてその後の汚染性野生型ウイルスの生成の可能性を削除する。

特定の言うと、カプシドタンパク質は、誘発可能な発現ベクターから独立して発現され、そのためベクターRNAとの組換えという結果をもたらす可能性のある配列は削除されるようになっている。一例を挙げると、カプシドタンパク質遺伝子は、ヌクレオチド7632-7655（順方向プライマー）及び8415-8439（逆方向プライマー）に対し相補的なプライマー対を用いてプラスミドpVGS p6GENから増幅され、配列は以下の通りである。

順方向プライマー：

5'-GTCAAGCTTGCTAGCTACAACACCACCACCATGAATAGAG-3'

(配列番号37)

逆方向プライマー：

5'-CAGTCTCGAGTTACTACCACTCTTCTGTCCCTTCCGGGGT-3'

(配列番号41)

そのそれぞれの相補性に加えて、順方向プライマーはその5'-末端にNhe I 及びHind III認識配列を含み、逆方向プライマーはその

5'-末端にUAG及びUAA翻訳ストップコドン及びXho I 認識配列の両方を含んでいる。標準的2温度循環プロトコルを用いて増幅が達成され、結果として得られたアンプリコンは酵素Nhe I 及びXho I で消化され、1%のアガロースゲル中で精製される。デキサメタゾン誘発可能なMMTV LTRプロモーター配列を含む発現プラスミドpAM (Clontech) を酵素Nhe I 及びXho I で消化させ、プラスミドDNAを1%のアガロースゲル内で精製する。カプシドタンパク質遺伝子フラグメントはpAMベクター内に連結され、結果として得られる構成体はpAM-SinCとして知られている。プラスミドpAM-SinCを、前述のとおり適切な細胞系統内にトランスフェクションし、メーカーが記述する通りHAT (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン) 培地を用いて、安定したトランスフェクタントについての選択を達成する。

糖タンパク質遺伝子E1及びE2は、前述の誘発可能な系の1つを用いて一緒に発現される。例えば、E1及びE2遺伝子は、シンドビスヌクレオチド8440-8459 (順方向プライマー) 及びシンドビスnls. 11,384~11,364 (逆方向プライマー) に対して相補的なプライマー対を用いて、プラスミドpVGS p6GENから増幅される。PCR増幅は、標準的な2温度循環プロトコルを以下のオリゴヌクレオチド対を用いて行なわれる：

逆方向プライマー (11384R)：

5'-TATATGCGGCCGCTCATCTTCGTGTGCTAGTCAG-3'

(配列番号39)

順方向プライマー (8440F)

5'-TATATGCGGCCGACCAACCATGTCCGCAGCACCACTGGTCACG-3'

(配列番号42)

そのそれぞれの相補性に加えて、順方向プライマーは、「枠内」

AUG翻訳開始コドンを含み、両方のプライマー共、その5'-末端にNot I 認識配列を含んでいる。PCR増幅の後、アンプリコンは、Not I 酵素で消化され、1%のアガロースゲル中で精製される。次に、結果として得られたフラグメントを別々にpOP13及びpOPRSV1ベクター (Stratagene) 内に連結させ、Not I で消化させ、前述の通り仔ウシ腸内アルカリ性ホスファターゼで処理する。カプチドタンパク質発現構成体で予めトランスフェクションを受けた細胞をトランスフェクションするためにこれらの糖タンパク質発現ベクターを使用する。

#### 5. シンドビスパッケージング細胞システムを作り出すための構成要素のアッセンブリー

例示を目的として、構成要素のアッセンブリーを実証するのに *Aedes albopictus* (セシヤブカ) を使用する。ただし、シンドビスパッケージング細胞システムを作り出すのに、考えられるその他の親細胞システムを使用することもでき、これについては前述した。 *Aedes albopictus* 蚊細胞 (ATCC No. CTL 1660) を、可欠アミノ酸、2 mMのL-グルタミン、アールの平衡塩溶液、0.11%の重炭酸ナトリウム及び10%のウシ胎児血清を含む最少必要培地 (イーグル) (最適培地) 中の5%のCO<sub>2</sub>の中で、28℃にて成長させる。35mm入りのペトリ皿の中で成長させた約5×10<sup>5</sup>の蚊細胞を、供給業者が提案するとおり、血清を含まない培地条件で5 μlのトランスフェクタム (Promega) カチオン性脂質試薬を用いて5 μgのp3' SSでトランスフェクションする。ただし、電気穿孔法、リン酸カルシウム沈降によって、又は当該技術分野において一般に知られている容易に入手可能なカチオン性リポソーム製剤及び手順のいずれかを用いることによって、あらゆるトランスフェクション方法を実施することができる。トランスフェクションから24時間後に、200 μg/mlの抗生物質



ハイグロマイシンで補足された上述の最適培地4ml用いて、細胞をオーバーレイし、10~14日の期間にわたり選択する。次に、膨張したクローンを分離し、ノーザンブロットハイブリダイゼーションによりLacリプレッサーの発現についてテストする。その後、十分なレベルのLacリプレッサーmRNAを発現する個々のクローンを、シンドビス構造タンパク質（すなわちpOP13-SINSP又はpOPRSV1-SINSP）を発現するlacオペロンベクター構成体を用いて再度トランスフェクションし、それに続いて200~800  $\mu$ g/mlのゲネチジンでの薬物選択及び連続的ハイグロマイシン選択が行なわれる。その後、両方の抗生物質に対する耐性を表わしているコロニーを次にプールし、希釈クローニングし、増殖させる。その後個々のクローンを12時間5mMのIPTGで誘発させ、高レベルのシンドビス構造タンパク質発現についてスクリーニングする。特異的抗体（文献中にて入手可）を用いたウェスタンブロット分析、又はシンドビス構造タンパク質遺伝子領域のRNAに対して相補的な<sup>32</sup>P末端標識付けされたRNAプローブを用いたRNアーゼ防御検定内でのシンドビス特異的RNAの数量化によって発現を試験することができる。これらの検定手順は、IPTGでの誘発に応答しての最高レベルの構造タンパク質発現をもつクローンを明らかにする。このとき、機能的活性について、最高の発現を行なう蚊細胞クローン（*Albopictus* SINpak細胞と呼ぶ）のいくつかを試験する。機能的活性は、ルシフェラーゼ発現ベクターをパッケージングする細胞系統の能力及びBHK-21細胞を再感染させルシフェラーゼ活性をトランスファする培地上清のその後の能力を実証することによって、試験される。

具体的に言うと、35mm入りペトリ皿の中で、ハイグロマイシン及びゲネチシンを含む上述の選択培地を用いて、成長させた*Albopictus* SINpak細胞を、上述のpSKSINBV-luc cDNAのインビトロ転写（

Promega）によって合成されたRNAを用いてトランスフェクションさせる。トランスフェクションから1時間後に、培地に5mMのIPTGを補足する。トランスフェクションから24時間後に上清を収穫し、BHK-21細胞を直接感染させるのにこれを用い、*Albopictus* SINpak細胞の新鮮な単層を少なくとも12時間5mMのIPTGを用いて上述のとおり誘発させる。感染からの上清を感染から24時間後に収穫し、次に

、35mmのペトリ皿の中で成長させたBHK-21細胞の第2の単層を感染させるのにこれを用いる。感染から16時間後に、BHK-21細胞を溶解させ、上述のとおりルシフェラーゼ活性について試験する(Promega)。1回目のベクター産生の後感染を受けたBHK21細胞から得たルシフェラーゼ活性を2回目のベクター再生の後感染を受けたBHK-21細胞と比較すると、発現レベルで少なくとも10倍の差が実証されるはずである。レベルの差が10倍より低いならば、トランスフェの後のトランスダクションの効率の低下は、過渡的ベクターを産生した同一のシンドビスパッケージング細胞系統上の占有させた細胞レセプターのせいである可能性がある。このことは、偽性型別されたシンドビスベクターの産生がエンベロープ関連パッケージング細胞系統内へのトランスダクションの効率を改善することが必要であるということを表わしているかもしれない。

### C. シンドビス生産者細胞系統のための誘発可能なベクター及び構造タンパク質の発現

#### 例1: ウイルス性プロモーターの使用

シンドビスベクター生産者細胞系統を開発しようとする挑戦は、哺乳動物の細胞がそれに感染するとほぼ排他的に生産性溶解細胞を死滅させる結果となるようなウイルスを何とか変換してこれらの同じ細胞中の持続性感染を樹立させることができるか否か、という問題にある。1つの可能性は、感染後にウイルスの持続性が結果とし

てもたらされるような蚊細胞からのシンドビスベクター生産者系統を生成することにある。しかしながら、持続的に感染を受けた蚊細胞の中で産生された感染性ウイルスの力価は、わずか約  $1 \times 10^4$  PFU/mlにすぎず、これは、BHK細胞のシンドビス溶解性感染の後に見られるものよりも少なくとも5ケタ小さいものである。かくして、蚊由来のシンドビスベクター生産者細胞系統を開発することは、商業的に実施可能でないかもしれない。

生産的細胞溶解感染が適正な刺激の後にのみ起こるように、ベクター及びウイルスの構造遺伝子カセットの両方を含む誘発可能なシンドビスベクター生産者細胞系統について、数多くの戦略が記述されてきた。これらのアプローチは「フィ

ードフォワード」レベルで作用することから、系内に漏出性があるとシンドビスの生活環の開始及び細胞の死滅という結果をもたらすことになる。

開発の保証は、分化状態に依存する遺伝子発現パターンにある。遺伝子発現パターンは、未分化状態と末端で分化された状態の間で大幅に異なっている。従って、その分化状態を制御することのできる細胞が、シンドビスベクター生産者細胞系統を誘導すべき理想的宿主である可能性がある。このような形態では、ベクター及び構造的構成要素は、記述されたELVIS戦略に従って、末端分化状態誘発可能プロモーターに共役（カップリング）され、未分化の宿主細胞を安定した形で形質転換するために使用される。

適切な刺激による誘発の後の宿主生産者細胞の末端分化は同時に、シンドビス複製サイクルの誘発とパッケージングされたベクターの産生という結果をもたらす。アンチセンス構造遺伝子及び非相同ウイルス発現系を含む、本書に記述されているその他の戦略は、以下で記述する細胞分化状態依存性プロモーターと共役されることになる。

このアプローチでは、末端でのみ分化された細胞の中で活性であるウイルス性又は細胞性プロモーターのいずれかを用いた3つの例について記述される。

マウスポリオーマウイルス (Py)、SV40及びモロニーマウス白血病ウイルス (M-MuLV) が全て、未分化のマウス胚性ガン腫 (EC) 細胞を感染させその中に入ることのできるものであるが、それらの遺伝子（及び非相同遺伝子）の発現及び生産的感染の樹立は遮断されている、ということが示されてきた (Swartzendruber 及び Lehman, J. Cell. Physiol. 85: 179~188, 1975; Peries et al., J. Natl. Cancer Inst, 59 463-465, 1977)。これらのウイルス成長特性は、マウス奇形ガン腫の悪性基幹細胞に由来する2つの細胞系統PCC4及びF9の中で実証された。ウイルス増殖の遮断は、転写及び複製のレベルで起こり、ウイルス非コーディング制御領域内に含まれたエンハンサーに対しマッピングする (Linney et al., Nature 308: 470~472, 1984; Fujimura et al., Cell 23: 809~814, 1981; Katinka 及び Yaniv, Cell 20: 393~399, 1980)。

M-MuLVが未分化のEC細胞を感染させた時点で、ウイルスDNAはゲノム内に組込

まれる。しかしながら、上述のように、ウイルス遺伝子又は非相同遺伝子の発現は遮断される。ウイルス発現のこの遮断はレチノイン酸を成長培地に付加することによるEC細胞の末端分化の時点で解除される。

EC細胞内のpVGELVIS構成体のRNA発現特性を試験するため、供給業者が提案する条件 (ca. 5  $\mu$ g のDNA/8 mgの脂質試薬) に従って、リポフェクタミン (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD) とプラスミドDNAの複合体を形成させ、約75%の集密性で未分化のPCC4又はF4細胞を含む35mmのウェルに付加する (Fujimura et al., 1981, Cell 23: 809-814)。細胞変性効果 (CPE) の発生及び培地上清のプラー

ク検定により数量化されたシンドビス生産的感染のレベルを、未分化の及び分化したトランスフェクションを受けた細胞の中で5日にわたって規則的な間隔で測定する。F9及びPCC4細胞の分化は、1  $\mu$ Mの最終濃度でレチノイン酸 (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) の付加によって達成される。

M-MuLVベクターの感染を受けた未分化のEC細胞の中で観察される非相同遺伝子の相対的発現の階層が一部には挿入依存性のものでありうるということが提案されてきた (Linney et al., 1987, J. virol. 61: 3248-3253)。かくして、pVGELVISでのトランスフェクションを受けた未分化のEC細胞は、シンドビスゲノミックcDNAの転写そして今度はウイルス生活環の開始という点で、異なる結果をもたらす可能性が高くなる。この場合、pVGELVISでのトランスフェクションを受けた未分化EC細胞のG418選択の後、残りの細胞はクローニングされ膨張させられる。このとき細胞クローンは、1  $\mu$ Mという最終濃度でレチノイン酸を付加することにより (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo)、分化後のシンドビスウイルスの産生について試験される。

シンドビスNSPの存在下でのその構造タンパク質産生が細胞分化状態に依存しているベクターパッケージング細胞系統を分離するため、上述のとおり、未分化F9及びPCC4細胞をpLTR/SINd1BspEを用いてトランスフェクションし、G418で選択する。次に、パッケージングされたSIN-lucベクターを用いた高い多重度での感染により、分化状態に感応性あるクローンを選択する。細胞溶解に対して耐性ある又はパッケージングされたSIN-lucベクター粒子を産生しないクローンは、ベ

クターパッケージングクロンの候補である。これらの候補クロンを、記述の通り、レチノイン酸での末端分化の後のSIN-lucベクター分子産生について試験する。

マウス野生型ポリオーマウイルス(Py)は、奇形ガン腫細胞系統PCC4又はF9の中で複製できない。未分化細胞内でのこの複製遮断は、早期領域(すなわちT抗原)遺伝子の転写レベルで起こり、ビタミンAでの末端分化の誘発により解除される。未分化のPCC4及びF9細胞内で生産的感染を樹立することのできるPy突然変異体は、ウイルスエンハンサー領域に対しマッピングする。胚組織特異的転写エンハンサー要素の発生は、これらの突然変異体という結果をもたらした。未分化奇形ガン腫細胞系統内のPy複製の阻害というこの特性を活用するため、エンハンサーを含むウイルス調節非コーディング領域を、ELVIS戦略に従って、シンドビスウイルスのゲノミックcDNAに結合させる。Py早期領域の精確な転写開始部位が決定されてきた(Tooze, DNA腫瘍ウイルス参照)。PCC4及びF9細胞系統は、Py-シンドビスベクターを用いて安定した形で形質転換される。このモデルにおいては、培地にレチノイン酸を付加し末端分化を誘発させた後で、シンドビス生産的感染が起こる。

ウイルス性エンハンサー、21bpの反復、複製原点、CAAT及びTATAボックス、及び早期mRNA転写5'キャップ部位に対応する配列を含む、塩基5021-152からのPy非コーディング領域は、5'ウイルス端部に位置づけられ、かくしてnvivoでは、わずか単一キャップのC残基のみがシンドビス5'末端に付加されるようになっている。Py非コーディング領域及びシンドビス5'末端の並置が、以下で詳述するようにPCRを重複させることによって達成される。第1の一次PCR反応におけるPy非コーディング領域の増幅が、pBR322/Py、菌株A2プラスミド(ATCC番号45017-p53, A6.6(pPy-1))及び以下のプライマー対を含む反応の中で達成される：  
順方向プライマー：pybgl 5021F(バッファ配列/bgl II bgl II認識配列/Pynts 5021-5043)

5'-TATATAGATCTCTTGATCAGCTTCAGAAGATGGC (配列番号43)

逆方向プライマー : SINPy 152R (SIN nts 5-1/Py nts 152-134)

5'-TCAATGGCGGGAAGAGCGGTTGG (配列番号44)

以上に示したプライマー対を用いたPy非コーディング領域のPCR増幅が、テルメラーゼ熱安定性DNAポリメラーゼ (Ameresco Inc., Solon, Ohio) 及び供給業者が供給した1.5mMのMgCl<sub>2</sub>を含む緩衝液を用いて行なわれる。付加的には、反応には、以下に示すPCR増幅プロトコルを用いて、5%のDMSO及びHot Star Waxビーズ (Perkins-Elmer) が含まれる:

温度 (°C)	時間 (分)	サイクル数
94	2	1
94	0.5	
55	0.5	35
72	0.5	
72	10	1

第2の一次PCR反応でのシンドビス 5' 末端の増幅が、pVGS p6GENクローン及び以下のプライマー対を含む反応において達成される:

順方向プライマー (py nts 138-152/SIN nts 1-16)

5'-CCGCCTCTCCCGCCATTGACGGCGTAGTAC (配列番号45)

逆方向プライマー (SIN nts 3182-3160) :

5'-CTGGCAACCGGTAAGTACGATAC (配列番号46)

上述のプライマー対を用いたシンドビス 5' 末端領域のPCR増幅は、以下のPCR増幅プロトコルを用いて、上述の反応条件によるものである。

温度 (°C)	時間 (分)	サイクル数
94	2	1
94	0.5	
55	0.5	35
72	3.0	
72	10	1

一次PCR反応からの442bp及び3202bpの産物は、Gene Clean (BIO 101) で精製

され、以下のプライマー対を用いてPCR反応の中で一緒に用いられる。

順方向プライマー：Pybgl-5021F(バッファ配列/Bgl-<sup>II</sup>認識配列/Pynts-5021-504

3) : 5'-TATATAGATCTCTTGATCAGCTTCAGAAGATGGC(配列番号47)

逆方向プライマー：(SIN-nts-2300-2278) :

5'-GGTAACAAGATCTCGTGCCGTG(配列番号48)

上述のプライマー対でのプライマーPCRアンプリコン産物の(？)PCR増幅は、以下のPCR増幅プロトコルを用いて、上述の反応条件によるものである。

温度(℃) 時間(分) サイクル数

94 2 1

94 0.5

55 0.5 35

72 3.0

72 10 1

第1の一次PCRアンプリコン産物の20の3'末端塩基は、第2の一次PCRアンプリコン産物の20の5'末端塩基と重複する：結果として得られる2,742bpの重複する二次PCRアンプリコン産物を、0.8%のアガロース/TBE電気泳動により精製し、Bgl-<sup>II</sup>で消化させ、2,734bpの産物をBgl-<sup>II</sup>及びCIAPで処理されたpcDNASINbgl/xba(例3参照)内に連結させる。結果として得られた構成は16,641bpsであり、ELVIS-PySINとして知られている。ベクターパッケージング細胞系統の誘導のためのpLTR/SindI-Bspに類似した構造タンパク質発現ベクターを構築するため、BspE-Iを用いて完成するまでELVIS-PySIN構成を消化し、塩基422-7054間の非構造タンパク質の欠失を達成するため、希釈条件下でこれを再結合させる。この構成は、ELVIS-PySIN-BspEとして知られている。

ELVIS-PySINプラスミドDNAを、供給業者により提案された条件(ca. 5 μgのDNA/8mgの脂質試薬)に従ってリポフェクタミン(GIBCO-BRL, Gaithersbury, MD)と複合体形成させ、約75%の集密性で未分化のPCC4又はF9細胞を含む35mmのウ

エルにこれを付加する。細胞変性効果(CPE)の発生及び培地上清のプラーク検定によって数量化されるシンドビス生産的感染レベルは、未分化の及び分化されたPCC4又はF9細胞の中で5日の規則的間隔で測定される。F9及びPCC4細胞の分化は、 $1\mu\text{M}$ の最終濃度でレチノイン酸(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo)を付加することによって達成される。

未分化のEC細胞がELVIS-PySINでのトランスフェクションに対する非相同応答を示す場合、pVGELVISのトランスフェクションを受けた未分化のEC細胞のG418選択に続くシンドビスウイルスの増殖により溶解されなかった残りの細胞はクローニングされ、膨張させられる。その後、 $1\mu\text{M}$ の最終濃度でレチノイン酸(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo)を付加することにより、分化後のシンドビスウイルスの産生について細胞クローンを試験する。

シンドビスNSPの存在下で構造タンパク質の細胞分化状態依存性の発現パターンをもつ、ELVIS-PySINd1 BspEで安定した形でトランスフェクションを受けたベクターパッケージング細胞系統の分離を

ELVIS-PySINd1 BspEプラスミドについて上述した通りに達成する。

## 2. 細胞プロモーターの使用

この戦略の第3の例は、 $\beta$ -グロブリン遺伝子座制御領域を使用する。 $\beta$ -グロブリン多重遺伝子クラスタは、4つの発生調節された遺伝子を含んでいる。人間の発生の早期段階において、胚の卵黄嚢は造血組織であり、 $\epsilon$ -グロブリン遺伝子を発現する。この後には、胎児の肝臓内の $\gamma$ -グロブリン遺伝子及び成人骨髄内の $\delta$ -及び $\alpha$ -グロブリン遺伝子へのスイッチングが続く(Collins及びWeissman, 1984, Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 31:315)。

少なくとも2つのマウス赤白血病系統MEL及びFriendが、 $\beta$ -グロブリンの末端分化依存性発現のためのモデルとして役立つ。成長培地に2%のDMSOを付加することにより末端分化の誘発後のみにこれらの系統内で $\beta$ -グロブリンの発現が観察される。

$\beta$ -グロブリン遺伝子座全体は、遺伝子座制御領域(LCR)により調節される。LCR内にあるのは、コーディング領域の5'であるDNアーゼI過敏性領域内にある



優性制御領域(DCR)である。DCRは5つのDNアーゼI過敏性(HS1-HS5)部位を含む。DCRは、トランスジェニックマウス及び安定した形でトランスフェクションを受けたマウスの赤白血病(MEL)細胞内の結合されたヒト $\beta$ -グロブリン遺伝子上での組み込み独立型でコピー数依存型の発現の高レベル部位を導く。(Grosveld et al., 1993, CSHSOB 58:7-12)。最近の研究では(Ellis et al. 1993 EMBO 12:127-134)、HS2内の配列に一致する合成コアのコンカテマーが、遺伝子座制御領域として機能することが示された。

シンドビスベクターの分化状態依存型発現を達成するため、ウイルスのゲノミックcDNAを、LCRHS2部位に対応する縦列合成コアを含むプロモーターと並置させる。代替的には、相同組換えにより内因

性 $\beta$ -グロブリン遺伝子内でLCRの下流に望ましいシンドビスベクター構成体を挿入することができる。このような戦略においては、末端分化後の $\beta$ -グロブリン転写開始部位をまず決定して、シンドビスベクターを精確に出発部位に置くことができるようになっている。

宿主細胞の分化状態によって溶解性ウイルス生活環の開始が制御される、ここで提案されている戦略は、ウイルスが誘発する細胞病理の制御が望まれるその他の系において利用できるはずである。

### 3. 分化状態により制御される誘発可能なプロモーターの中へのベクター構成体の挿入

例3に記述されているようなELVIS形態に位置づけされたシンドビスベクターからの非相同遺伝子の発現が分化状態に依存したものであるクローンの生成を、pVGELVIS, pLTR/Sind1 BspEプラスミドについて上述のとおり達成する。そのベクターを粒子産生が分化状態に依存しているクローンの生成を、ELVIS非相同遺伝子発現ベクターを用いて上述の分離した分化依存性ベクターパッケージングクローンをトランスフェクションすることによって達成する。レチノイン酸により誘発された分化後に望ましい表現型又はベクター産生を有するクローンを、上述のとおり分離する。

### D. 非相同アストロウイルス接合領域からの構造タンパク質の発現

ベクターパッケージング系の重要な特性の中には、ベクターと構造遺伝子構成要素の間の組換えを通して野生型ウイルスを作り出すことなく、感染性粒子を生成するのに必要な構造的構成要素を細胞が発現するということがある。パッケージング細胞系統のこれら2つの望ましい特性は、個々の非相同RNAポリメラーゼI発現カセット上でのgag/pol及びenv遺伝子の構成性発現を通して、レトロウイルスベースの系において達成される。

ベクターパッケージング細胞系統のもう1つの重要な面は、野生型ウイルスの正常な複製戦略をできるかぎり密接に模倣する系を誘導することにある。この問題は、パッケージングされた組換え型ベクターの観察された力価レベルという点で重要なものである。接合領域プロモーターからの高レベルのサブゲノミックmRNAの転写及びそれに続く構造タンパク質への効率の良い翻訳の後で、シンドビス感染中のウイルス構造タンパク質の合成が達成される。接合領域プロモーターは、アンチセンス配向においてのみ機能的であり、アンチゲノミックRNAの合成は、非構造タンパク質の翻訳の後に起こり、かくして構造タンパク質の発現が遅延される。このため、シンドビスに関しては、それ自体組換え型ベクター分子から発現された非構造タンパク質によって活性化される接合領域プロモーターから構造タンパク質の合成が行なわれるようなパッケージング細胞系統を構築することが好ましいということになる。

選択模写メカニズムを介してシンドビスでの感染の間にRNAゲノミック分子の間の比較的高い頻度の組換えが起こるということが知られている (PNAS 1991 88 : 3253-3257)。ベクターと接合領域/構造遺伝子カセット。間の組換えは、恐らくはパッケージングされたベクター粒子100万につき1つの野生型ウイルスのレベルで野生型シンドビスウイルスの生成という結果をもたらすことになる (Liljestrom Bio/Technology 1991 9 : 1356-1361)。野生型ウイルスの生成を緩和する1つの方法は、レトロウイルスパッケージング細胞系統について使用されきわめて成功し、例7で前述したアプローチである、別々の発現カセットへと構造遺伝子を分離する方法である。

シンドビスベクターパッケージング細胞系統内の野生型ウイルス産生レベルを

低下させるもう1つのアプローチは、アストロウイルス

ス遺伝子要素の制御下で構造タンパク質を発現することである。この形態についての概略図が図10に描かれている。シンドビスウイルスと同様に、アストロウイルス構造タンパク質の発現は、サブゲノミックメッセージから高い構造タンパク質レベルが合成される接合領域戦略を取り入れている。アストロウイルス発現カセットは、以下の順序の2つの要素のうちの1つで構成されていてよい：(1) 誘発可能なプロモーター／アストロウイルス5'末端／アストロウイルス接合領域／シンドビス構造遺伝子／アストロウイルス3'末端、又は(2) アンチセンスアストロウイルス3'末端／アンチセンスシンドビス構造遺伝子／アンチセンスアストロウイルス接合領域／アンチセンスアストロウイルス5'末端／肝炎デルタウイルスリボザイム又は例7に記述されたその他の形態。両方の形態において、発現ユニットは、ウイルス複製の間に起こるものと同じメカニズムを通してアストロウイルス非構造タンパク質によって増幅される。接合領域から開始される多数回にわたるサブゲノミックmRNA合成は、各々の発現ユニットから起こることから、アストロウイルス非構造タンパク質による発現ユニットの増幅は、きわめて高レベルのシンドビス構造タンパク質の産生という結果をもたらすことになる。上述のシンドビス構造タンパク質発現カセットの第2の形態は、毒性シンドビス構造遺伝子の一次写しがアンチセンスであることから、第1の形態よりもうまく機能するかもしれない。第1の形態における構造遺伝子の発現は、ネガティブ鎖の合成とそれに続く接合領域からのポジティブサブゲノミックRNAの合成まで起こるはずがないものの、第2の形態における一次写しのアンチセンス性は、細胞障害性タンパク質の発現を防ぐ付加的な制御レベルを表わしている。

シンドビスウイルスの構造タンパク質がアストロウイルス接合領

域発現カセットから個別に合成されるパッケージング細胞系統内では、いかなる野生型ウイルスも生成されない可能性が高い。ベクターの非構造タンパク質領域とアストロウイルス構造タンパク質発現カセットの間の組換えは、生存不能な組合せであるシンドビスウイルス遺伝子とアストロウイルスシス要素の共役が見ら

れる分子という結果をもたらす。シンドビスシス及びトランス要素の適正な共役には、ベクターとアストロウイルス発現カセットの間、アストロウイルス接合領域と構造遺伝子ATGの間、そして構造遺伝子終止コドンとアストロウイルス3'末端の間に2つの精確な組換え事象が必要となる。野生型ウイルスを生成するためには、この2重組換え事象は、3つの別々のシンドビス構造遺伝子を取り込むべく同じ分子上で3回ずつ（合計6回の事象）起こらなくてはならない。

アストロウイルスタンパク質の考えられる毒性を減少させるために、アストロウイルス発現カセットの合成が誘発可能なプロモーターにより制御される。1つの可能性は、例7で前述した「lac-スイッチ」系に従ってlacオペロンを使用することである（Stratagene）。無償誘発物質IPTGの不在下でのオペロン制御された遺伝子の構成性発現レベルは、細胞1個につき約10コピーである。アストロウイルス／シンドビス構造遺伝子発現カセットに対応する誘発可能なプロモーターは、lacオペロン又はその他の非常に低い構成性発現レベルをもつ適当なプロモーターであってよい。非相同性ウイルスによりシンドビスタンパク質の制御が導かれているこれらの形態のパッケージング細胞系統の構築は、高力価の野生型ウイルスを含まないパッケージングされたベクター粒子の生成という結果をもたらすはずである。

以下に、本発明の他の実施形態及び変形例を、例8を以て説明する。

#### 例8 代替的ウイルスベクターパッケージング技術

ベクター構成体を支持する組換え型シンドビスウイルスを産生するためにさまざまな代替的系を使用することができる。これらの系の各々は、バキュロウイルス及び哺乳動物ウイルス、ワクチン及びアデノウイルスが近年、遺伝子クローニングの対象となつたいずれかの与えられたタンパク質を大量に作るように適合せられたという事実を利用するものである（Smith et al., *Mol. Cell. Biol.* 3:12, 1983; Piccini et al., *Meth. Enzymology* 153:545, 1987; 及びManson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:1359, 1985）。

これらのウイルスベクターは、ウイルスベクター内への適当な遺伝子の挿入により組織培養細胞内でタンパク質を産生するために使用でき、又シンドビスベク

ター粒子を作るように適合させることも可能なものである。

アデノウイルスベクターは、核複製ウイルスから誘導され、欠陥状態でありうる。ベクター内に遺伝子を挿入し、インビトロ構築 (Ballay et al., EMBO J. 4: 3861, 1986)、又は細胞内の組換え (Thummel et al., J. Mol. Appl. Genet. 1: 435, 1982) のいずれかにより哺乳動物細胞内でタンパク質を発現するのにこの遺伝子を使用することができる。

1つの好ましい方法は、(1) シンドビス非構造タンパク質、及び(2) 修正されたシンドビスベクター構成体を駆動するアデノウイルス主要後期プロモーター(MLP)を使用してプラスミドを構築することである。この形態における修正されたシンドビスベクターは、転写されたRNAベクターが天然の状況下でそうである通りに自己複製するものとなることができるようにする修正された接合領域をなおも含むことになる。

このときこれらのプラスミドを、インビトロでアデノウイルスゲノムを作るのに使用することができる (Ballay et al., Embo. J. 4: 3861, 1985)。複製欠陥性であるこれらのアデノウイルスゲノムは、293個の細胞 (アデノウイルスE1Aタンパク質を作っているヒトの細胞系統) の中でトランスフェクションされて、欠陥アデノウイルスベクター内に別々に支持されたシンドビス構造タンパク質及びシンドビスベクターの純粋な株を生み出す。このようなベクターの力価は標準的に $10^7 \sim 10^{11}$  / mlであることから、これらの株を、高い感染多重度で同時に組織培養を感染させるのに使用することができる。このとき、細胞は、シンドビスタンパク質及びシンドビスベクターゲノムを高いレベルで産生する。アデノウイルスベクターは欠陥性であることから、直接的細胞溶解は大量に起こらず、シンドビスベクターを細胞上清から収穫できる。

同じ要領で、一次細胞からベクターを生成するため、無関係のシンドビスベクター (例えばRSV, MMTV又はHIV) から誘導されたものといったその他のウイルスベクターを使用することも可能である。一つの実施態様においては、これらのアデノウイルスベクターを一次細胞と合わせて使用してシンドビスベクター調製物を生み出している。

キメラHIV/ポリオウイルスゲノムが、融合タンパク質を発現することのできるキメラミニレプリコンの生成 (J. Virol. 65: 2875, 1991) を結果としてもたらず代替的発現系についても同様に記述されている。これらのキメラポリオウイルスミニレプリコンは後に、包膜され、キメラミニレプリコンの中で欠陥のある置換されたポリオウイルスカプシド前駆物質P1タンパク質を発現する組換え型ワクチニアウイルス (VV-P1) を用いることによって感染性粒子を産生するものであることが実証された (J. Virol. 67: 3712, 1993)。この研究において、HIV-1 gag-pol配列は、ポリオウイルスのP1カプシド配列に置換された。

カプシドのVP2及びVP3カプシド遺伝子に置換させられた。類似のやり方で、シンドビスベクターゲノムをP1カプシド配列に置換させ、この系内で、インビトロ転写されたシンドビスRNA写しを細胞系統内にトランスフェクションした後ポリオ偽性型別シンドビスベクターを提供するための手段としてこれを使用することが可能である。換言すると、シンドビス構造タンパク質は同様に、VP2及びVP3配列を置換し、その後シンドビスベクターのための代替的パッケージング細胞系統系を提供することができる。

1つの代替的系においては、以下の構成要素が用いられる：

1. Smith et al. (前出) の中で記述されているものと類似の要領でバキュロウイルス系内 (又は酵母又はE. coliといったようなその他のタンパク質産生系内) で作られたシンドビス構造タンパク質；
2. 既知のT7又はSP6又はその他のインビトロRNA生成系 (Flamant et al, J. Virol. 62: 1827, 1988) の中で作られたウイルスベクターRNA；
3. 酵母又は哺乳動物組織培養細胞から精製された又は (2) の通りに作られたtRNA；
4. リボソーム (包埋されたenvタンパク質を伴う) ；及び
5. RNA処理及びいずれかの又はその他の必要な細胞由来の機能を提供するものとして同定された場合の (標準的にマウスの細胞からの) 細胞抽出物又は精製された必要な構成要素。

この手順内で、(1)、(2) 及び(3) が混合され、その後、env随伴シン

ドビスタンパク質、細胞抽出物及びプリリポソーム混合物（適当な溶剤中の脂質）が付加される。（１）、（２）及び（３）の混合物に対して結果として得られたリポソーム包埋envを付加する前にリポソーム内にシンドビスenvタンパク質を包埋するこ

とが必要である可能性がある。薬剤のリポソーム包膜のための方法と同じ要領で脂質プラス包埋シンドビスenvタンパク質で発生期のウイルス粒子を包膜できるようにするため、混合物を処理する（例えば、音波処理、温度操作又は回転透析による）（Gould-Fogerite et al., Anal. Biochem. 148 : 15, 1985）。この手順は、中間パッケージング細胞系統を樹立するという必要条件無しに、高力価の複製不全シンドビスウイルスベクターを産生する。

#### 例9

#### 細胞系統又は組織特異的シンドビスベクター・「ハイブリッドエンベロープ」

シンドビスウイルスの組織及び細胞型特異性は、ウイルスコーディングされた外被タンパク質E1及びE2によりまず決定される。これらのビリオン構造タンパク質は、ウイルス粒子が感染細胞の表面から発芽したときに得られる宿主細胞由来の脂質エンベロープの中に包埋された膜内外糖タンパク質である。このエンベロープは、単一のカプシドタンパク質の多重高次コピーと複合体形成したゲノミックRNAで構成されている二十面体ヌクレオカプシドを取り囲んでいる。E1及びE2外被糖タンパク質は、3量体構造内にアッセンブリー（集合）すると思われるヘテロダイマーとして複合体形成され、ビリオン表面上に特徴的な「スパイク」を形成する。その上、これらのタンパク質の細胞質テイルはヌクレオカプシドと相互作用し、新しいウイルス粒子のアッセンブリーを開始させる（Virology 193 : 424, 1993）。個々のシンドビス糖タンパク質に起因する特性としては、糖タンパク質E2によるレセプタ結合（Virology 181 : 694, 1991）、及び細胞質内へのヌクレオカプシド粒子の送り出しという結果をもたらすビリオンエンベロープとエンドゾーム膜の糖タンパク質E1を媒介にした融合（ポジティブ鎖RNAウイルスの新しい様相

、p166~172, 1990) がある。

本発明は、糖タンパク質活性 (特にE2であるがこれに限られるわけではない) を分析し無傷の非相同糖タンパク質を同時発現させること、又は、ハイブリッドエンベロープ遺伝子産物 (すなわち特定の言う、同じタンパク質分子内で天然には発見されない外因性結合ドメイン及びその天然の細胞質及び膜にまたがる領域を有するシンドビス外被糖タンパク質) を作り上げること、又はその組織向性においてシンドビスとは異なるその他のアルファウイルス又はその誘導体の糖タンパク質とこれらのE2及び/又はE1糖タンパク質を置換することによって、ビリオンアッセムブリーにとって必要とされる細胞質機能を分析することなく宿主範囲特異性を変えることができる、ということを認めている。かくして、導入されたタンパク質分子又はドメインの向性に応じて、予め選択された標的細胞に対して特異的に結合することになる組換え型シンドビスベクター粒子を産生することができる。

第1の形態においては、組織の向性を変えるため、その他のアルファウイルス又はその変異体からの類似の外被糖タンパク質E1及び/又はE2の置換が用いられる。例えば、ベネズエラウマ脳炎ウイルス (VEE) は、そのシンドビスウイルス相対物とは異なり、リンパ球由来の細胞に対する向性を示すアルファウイルスである。従って、VEE構造タンパク質を発現する細胞系統内にパッケージングされたシンドビスベクターは、パッケージング細胞構造タンパク質遺伝子カセットを提供した親VEEウイルスと同じリンパ向性を示すことになる。

特定のには、VEEウイルスのトリニダードロバ株 (ATCC #VR-69) をBHK細胞内で増殖させ、シンドビスのクローニングについて記述したものと類似の手順を用いてビリオンRNAを抽出する。構造タン

パク質コーディング領域全体を、周囲のKozakコンセンサス配列を含む真正AUG翻訳開始部位及びUGA翻訳停止部位に対しそれぞれマッピングする5'-末端をもつプライマー対を用いて増幅させる。順方向プライマーはVEEヌクレオチド7553-7579に対し相補性をもち、逆方向プライマーは、VEEヌクレオチド11206~11186 (Virology 170:19からの配列) に対し相補的である。構造タンパク質遺伝子に



対応するVEE cDNAのPCR増幅は、シンドビスについて記述されたとおりの2段階式送トランスクリプターゼ-PCRプロトコル、鋳型としてのVEEゲノムRNA及び以下のオリゴヌクレオチド対を用いて、達成される。

順方向プライマー (VEE 7553F)

5'-TATATGCGGCCGCACCGCCAAGATGTTCCCGTTCAGCCA-3'

(配列番号49)

逆方向プライマー (VEE 11206R)

5'-TATATGCGGCCGCTCAATTATGTTTCTGGTTGGT-3'

(配列番号50)

表示されたVEEヌクレオチドに対するそのそれぞれの相補性に加えて、各々のプライマーには、その5'末端にNot I 認識配列が含まれている。PCR増幅に続いて、3800bpのフラグメントを1%のアガロースゲルの中で精製させ、その後酵素Not I で消化させる。次に、結果として得られたフラグメントを前述のpOP13及びpOPRSV1ベクター (Stratagene) の中に別々に連結させ、これらのベクターをNot I で消化させ仔ウシ腸内アルカリ性ホスファターゼで処理する。完全なVEE構造タンパク質コーディング配列を含む、これらの結果として得られたベクターは、pOP13-VEESP及びpOPRSV1-VEESPとして知られている。パッケージング細胞系統の開発におけるこれらのクローンの使用は、シンドビスパッケージングラインについて記

述されたものに追従する。さらに、本特許においてシンドビスについて概略説明された系及び当該技術分野で既知の標準技術を用いて、lacオペロン-VEE構造タンパク質遺伝子発現ベクターの変形態様も構築する。その上、VEEの変異体及び組織向性が異なっているその他のアルファウイルス及びその変異体が、このアプローチに従う場合に有用なものである。

第2の形態では、エンベロープシンドビスベクター粒子を産生することのできるパッケージング細胞系統の脂質2重層の中で、非相同糖タンパク質又は細胞リガンドが発現される。この形態は、VSV-G偽性型別シンドビスベクターの産生について例6で記述したものと類似している；ただし、この形態では、E2レセプタ

結合機能は、挿入、欠失又は塩基特異的配列突然変異誘発によって不活性化される。E2のレセプタ結合機能は、非相同糖タンパク質又は細胞リガンドにより供給されるものにベクター粒子向性を制限するように不活性化される。VSV-G偽性型別の列に加えて、シンドビスパッケージング細胞系統内に安定した形でトランスフェクションされた標準ベクターから発現された場合には、特定の細胞レセプタ（例えばCD4細胞ターゲティングのためのレトロウイルスHIV gp 120タンパク質）をターゲティングするその他のウイルス糖タンパク質が利用される。

第3の形態では、インビトロの特定の細胞系統又はインビボの組織タイプへとシンドビスウイルスベクターをターゲティングすることができるようにするキメラ糖タンパク質も調製される。このようなキメラ糖タンパク質を構築するためには、シンドビス構造タンパク質発現ベクターへと置換されうるインサート配列を増幅させるのに、望ましいレセプタのリガンド結合ドメイン及び相同性シンドビス配列（唯一の特異的制限エンドヌクレアーゼ部位を含むもの）を

含む特異的オリゴプライマが用いられる。代替的には、許容的挿入部位に消化し戻すために適当な制限酵素部位からの制限されたBcl-1消化を行ない、その後続いて、小さいレセプタ結合ドメインをコードするフラグメント、又は全ウイルス糖タンパク又は細胞表面リガンドの平滑末端連結が行なわれる。一例を挙げると、HIV gp 120外被タンパク質（Virology 185 : 820, 1991）の主要な中和ドメインに対応するペプチドを、正常なE2向性を分断しCD4細胞ターゲティングを提供するのに用いることができる。

HIV gp 120の例は1つのハイブリッドタンパク質を例示しているが、可能性がウイルス糖タンパク質に制限されているわけではない。例えば、ヒトインターロイキン-2のレセプタ結合部分は、IL-2レセプタをもつ細胞内にベクターをターゲティングするようシンドビスの外被タンパク質と組み合わせられる。その上、抗体のFc部分を認識する外被タンパク質を用いて組換え型シンドビスベクター粒子を作り出すのに、前述の技術を使用する。このとき、予め選択された標的細胞のみを認識するモノクローナル抗体をこのようなFcレセプタを支持するシンドビスベクター粒子に結合させ、ベクター粒子がこれらの予め選択された標的細胞（

例えば腫瘍細胞)のみに結合しこれを感染させるようにする。代替的には、ビオチニル化された抗体又はその他のリガンドでコーディングされた細胞をターゲティングするため、アビジンの結合ドメインをもつハイブリッドエンベロープが使用される。患者はまず抗体でのフラグディングを受け、次にベクターの投与に先立ち未結合の及び非特異的に結合した抗体を一掃する時間をもらう。ビオチンに対するアビジン結合部位の高い親和性(10~15)は、モノクローナルイメージにより同定されたものとの組織に対する精確かつ効率の良いターゲティングを可能にしてくれる。

#### 例10

##### シンドビス接合領域の制御下での $\beta$ -ガラクトシダーゼを発現する細胞系統の感染による調製物内のベクターユニットの決定

$\beta$ -ガラクトシダーゼを発現するリポータ細胞系統の感染による調製物内のベクターユニットの決定。

患者に適正な治療用量のベクターを投与するためには、調製物中に含まれたベクター感染性ユニットを容易に決定することのできる方法を誘導することが望ましい。これは、その細胞内に機能的シンドビス非構造タンパク質が存在する場合にのみ $\beta$ -ガラクトシダーゼ又はもう1つのリポータ遺伝子を発現する細胞系統を生成することによって達成される。個々の細胞が複数のベクター粒子による感染を受けず、かくして力価又はベクターユニットを決定できるように、増大する希釈度のシンドビスベクター調製物で細胞系統を感染させることができる。従って、この細胞系統は、ベクター調製物の中に存在する機能的粒子の検定法である。

##### A. シンドビス非構造タンパク質の制御下で機能的 $\beta$ -ガラクトシダーゼタンパク質を発現する細胞系統の生成

1つの形態においては、シンドビスRNAの転写を開始させることのできる5'-末端配列、シンドビス接合領域、リポータ遺伝子及びマイナス鎖合成のための3'-末端シンドビスRNAポリメラーゼ認識配列を含む真核性発現カセットが構築される。このカセットは、真核性転写プロモーターに隣接してアンチセンス配

向で位置づけられる。付加的にはこれらの構成体は、同様に、5' -末端配列のシンドビスヌクレオチド1に直ぐ隣接して、精確にこのシンドビスヌクレオチドの後で一次RNA写しの分割という結果をもたらすことになる触媒リボザイム配列を含んでいてよい。このアンチセンス配向では、リポータ遺伝子は翻訳され得ず、リポータ遺伝子発現に先

立つポジティブ鎖のmRNA内への転写のためのシンドビス非構造タンパク質の存在に完全に依存している。これらの非構造タンパク質は、滴定されているシンドビスベクター調製物によって提供されることになる。さらに、この形態は、精確なシンドビスゲノム5' -及び3' -末端配列を含むよう設計された場合、シンドビスベクターによって提供されるものと同じ非構造タンパク質を利用することにより、リポータ遺伝子の写しが増幅を受けることができるようにする。

このアンチセンス滴定構成の例は、以下のとおりである。酵素Sac I を用いてプラスミドpSKSINBV-lacZを消化させる。これは、シンドビス3' -末端及びポリA配列の直後で分割する。酵素T4 DNAポリメラーゼ及びdNTPを付加しその後16℃で10分間インキュベートすることにより、突出する3' -末端を平滑にする。15分間75℃でのインキュベーションにより、T4 DNAポリメラーゼを熱で不活性化し、直線化されたプラスミドを次に酵素BamH I で消化させ、これは、シンドビス接合領域の上流、ヌクレオチド7335のところで切断する。結果として得られたフラグメントを1%のアガロースゲル中で精製し、酵素Xba I で消化され上述のとおり平滑末端にされBamH I で消化され1%のアガロースゲル内で精製され仔ウシ腸内アルカリ性ホスファターゼで脱リンされたpMCS-26s (例7に記述) を用いて連結させる。

次に、pMCS-lacZとして知られている結果として得られた構成体を、重複PCR増幅 (図7に詳述) を用いて、肝炎デルタウイルス (HDV) の抗ゲノミック鎖からの84ヌクレオチドリボザイム配列に融合されたシンドビスの5' -末端299ヌクレオチドを含むように修正する。最初、別々のPCR反応の中で2つのプライマー対を使用し、それに続いて2回目のPCRにおいてそれらの重複合成を行なう。反

応#1はプライマーHDV 17~18 (配列番号\_\_)とHDV 49-XC (配列番号\_\_)を含み、反応#2は、プライマーSIN-HDV (配列番号\_\_)及びSIN276-SPE (配列番号\_\_)そして鋳型としてのプラスミドpVGS p6GENを含んでいる。PCR増幅は、標準的な2温度循環プロトコルによって達成される。第1回目のPCR増幅の後、反応#1と反応#2の各々からの合計量の1/20を組合せ、プライマーHDV 49-XC及びSIN276-SPE及び標準的2温度循環プロトコルを用いた2回目のPCR増幅において鋳型としてこれを使用する。2回目のPCRの後、414bpのアンプリコンをMermaidキット (Bio 101, La Jolla, CA)で精製し、酵素Cla I 及びSpe I で消化させる。1%のアガロースゲル中で消化されたアンプリコンを精製し、その後、同様にCla I とSpe I で消化され1%のアガロースゲル中で精製されるプラスミドpMCS-LacZ内に連結させる。発現カセット要素HDV抗ゲノムリボザイム/シンドビス5'-末端299 nts./接合領域/lacZ遺伝子/3'-末端未翻訳領域を含む、結果として得られた構成体は、pd5' LacZとして知られている。

プラスミドpd5' LacZからのLacZ発現カセットをその後pcDNA3内に挿入する (Invitrogen Corp., San Diego, CA)。プラスミドpd5' LacZを酵素Not I で消化し、上述のとおり平滑末端化し、その後酵素Xba I で消化する。形態シンドビス3'-末端配列/lacZ遺伝子/接合領域/シンドビス5'末端配列/HDVリボザイムのアンチセンスリポータカセットRNAを転写するCMVプロモーターを含む、結果として得られた構成体は、pSINjra  $\beta$ -galとして知られている。

ポリカチオン試薬Transfectam (Promega, Madison WI) と複合体形成されたpSINjra  $\beta$ -galベクター5  $\mu$ gを用いて60mmのペトリ皿の中で成長させた $5 \times 10^5$ のBHK-21細胞のトランスフェクションによって、BHK SINjra  $\beta$ -gal細胞を誘導する。トランスフェクシ

ョンから24時間後に、培地に400  $\mu$ g/mlのG418 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD)を補足する。トランスフェクションを受けていない細胞が全て死滅し、G418耐性コロニーが分割し始めた後、細胞をトリプシン処理によってプレートからとり除き、プールし、その後限界希釈法によりクローニングする。シンドビスウイルスの野生型株の既知の力価での感染による機能的 $\beta$ -ガラクトシダーゼの産生につ

いて、いくつかのクローンを試験する。まず2%のホルムアルデヒド(37%の原液)/0.2%のグルタルアルデヒドを含む溶液でPBS洗浄された細胞を固定し次に0.5mMのフェリシアン化カリウム/0.5mMのフェロシアン化カリウム/2mMのMgCl<sub>2</sub>/1mg/mlのXgalを含む溶液で細胞を染色することによって、感染から6時間後に、の候補のBHK SINjra $\beta$ -galクローン中の機能的 $\beta$ -ガラクトシダーゼの産生を決定する。3時間以内に青色細胞が明確に見える。シンドビスウイルス株が高レベルの欠陥干渉(DI)粒子を含んでいないということを条件として、BHK-21細胞についてプラーク検定によって決定されるウイルス力価は、BHK SINjra $\beta$ -gal細胞上でのX-gal染色により観察された力価と類のものであるはずである。

例7に記述されているもののようなパッケージング細胞系統から産生されたベクターユニットで表わされたさまざまなシンドビスベクター調製物の力価は、いくつかのベクター希釈物でのBHK SINjra $\beta$ -gal細胞の集密的単層の感染によって決定される。ベクター調製物の力価は、上述のとおり $\beta$ -ガラクトシダーゼタンパク質を産生する細胞の視覚化によって、感染から6時間後に決定される。記述されたシンドビスベクターが構造遺伝子に対応するウイルス領域を含まないことから、BHK-21細胞中のプラーク検定によりベクター調製物の力価を決定することは不可能である。

代替的には、真核性プロモーター/ウイルストランスクリプター

ゼにより認識される5'-末端シンドビス配列/シンドビス接合領域/リポータ遺伝子/マイナス鎖合成のためのシンドビスRNAポリメラーゼ認識配列から成る異なるリポータカセット形態を用いることによって、滴定用細胞系統が産生され、センス配向で発現される。このリポータ発現カセットは、リポータ遺伝子をコードするサブゲノミックメッセージの転写に先立って、ベクターにより供給されたシンドビス非構造タンパク質によるアンチセンスRNA分子への合成を必要とする。

特定の言う、センス配向のパッケージング構成体は、以下のように作り上げられる。酵素Apa Iを用いてプラスミドpVGELVISを消化させ、これはシンドビス3'-末端のちょうど下流でヌクレオチド11737のところで分割する。T4 DNA

ポリメラーゼ及びdNTPの付加及び10分間16℃でのインキュベーションによりApa Iで消化されたDNAを平滑末端にする。ポリメラーゼの熱不活性化の後、DNAフラグメントを酵素Sfi Iで消化させ、1%のアガロースゲル内で10041bpのフラグメントを精製する。プラスミドpSKSINBV-lacZを酵素Sac Iで消化させ、上述のとおり平滑末端化する。その後、フラグメントをSfi Iで消化させ、1%のアガロースゲル中で7kbpのフラグメントを精製する。次に7 kbのpSKSINBV-lacZフラグメントを精製されたpVGELVISフラグメントナトリウム内に連結させてプラスミドpELVIS-bgalを作り出す。このプラスミドは、MuLV LTRプロモーターの制御下で完全なシンドビス非構造タンパク質、シンドビス接合領域、LacZ遺伝子及びシンドビス3'-末端レプリカーゼ認識配列を含む。プラスミドpELVIS-bgalをBspE Iで消化させ、Gene clean (Bio 101 corp., San Diego, CA) で精製し、自らに再度連結させる。BspEはnts 422-7054の間のシンドビス非構造タンパク質遺伝子配列を除去する。再連結された構成体は、全てのMuLV-LTRプロモーターの転写制御下にありかつ下流にある、シンドビスRNAの転写を開始することのできる5'配列、シンドビス接合領域、LacZ遺伝子をコードする配列、そしてマイナス鎖のRNAの合成のために必要とされるシンドビス3'-末端配列を含んでいる。この構成体は、pELVISdINSP-bgalとして知られている。

プラスミドpELVISdINSP-bgalを、BHK細胞中にトランスフェクションさせ、前述のとおり試験する。BHK, pELVISdINSP-bgal細胞は、シンドビストランスクリプターゼにより認識される、末端配列、シンドビス接合領域、LacZ遺伝子をコードする配列そしてマイナス鎖RNAの合成のために必要とされるシンドビス3'-末端配列を伴うRNA写しを産生する。BspE Iの欠失により作り上げられた終止コドンと上流の読取り枠のため、一次写しからのβ-ガラクトシダーゼ発現が防がれる。滴定されつつあるシンドビスベクターによって提供されたシンドビス非構造タンパク質の付加は、アンチセンス中間体の初期合成の後、シンドビス接合領域からの活性lacZ写しの転写という結果をもたらすことになる。さらに、この形態は、精確なシンドビスゲノム5'-及び3'-末端配列を含むよう設計されている場合、シンドビスベクターにより提供されたものと同じ非構造タンパク質を

利用することによってリポータ遺伝子の写しが増幅を受けることができるようにする。

もう1つの形態においては、センス配向で位置づけされたアンチセンスリポータ遺伝子とそれに続く3'-末端シンドビスレプリカーゼ認識配列を含む発現カセットを用いて、滴定用細胞系統が産生される。この構成体は、真核性プロモーターの制御下で、滴定されるキベクターによって提供されるシンドビス非構造タンパク質により認識され転写されるRNA写しを産生する。シンドビス非構造タンパク質は、一次リポータ写しの中の配列を認識し、今度はセンスリ

ポータ写しを合成する。この構成体はリポータ遺伝子写しの増幅から恩恵を受けず、それでもベクター滴定を可能にするのに十分な写しを提供しなければならない。

このタイプの滴定用カセットの構成は、以下のとおりである。pSV- $\beta$ -ガラクトシダーゼベクター (Promega Corp., Madison, WI) を酵素Hind IIIで消化させ、上述のとおり平滑末端にする。プラスミドをさらに酵素BamH I 及びXmn I で上述させて、LacZ遺伝子を除去し、残りのフラグメントのサイズを低減させる。LacZ遺伝子を含む3737nt. フラグメントを1%のアガロースゲルの中で精製し、酵素BamH I 及びEcoRVで消化された消化されたpcDN3 (Inuitrogen, San Diego, CA) 内に連結させる。この新しいプラスミド構成体は、pcDNAaLacZとして知られている。このプラスミドを、酵素Apa Iで消化させ、上述のとおり平滑末端にし、酵素Xho Iでさらに消化させる。プラスミドpSKSINBV (前述のもの) をSac Iで消化させ、上述のとおり平滑末端化し、その後Xho Iで消化させる。シンドビス3'レプリカーゼ認識配列を含む、結果として得られた146ntのフラグメントを、1.2%のアガロースゲル中で精製し、消化されたpcDNAaLacZベクター内に連結させる。再度連結された構成体は、アンチセンスLacZ遺伝子及び3'シンドビスレプリカーゼタンパク質認識配列をCMVプロモーターから下流のところに含んでいる。結果として得られた構成体は、pcDNAaLacZ-3'Sinとして知られている。この構成体はBHK細胞内にトランスフェクションされ、前述の通りに利用される。



## 免疫応答の誘発のためのHBV抗原を発現するベクター構成体の生成

### A. HBVE/コア配列の分離

B型肝炎の全プリコア/コアコーディング領域を含む1.8kb BamH I

I フラグメントをプラスミドpAM6 (ATCC No. 45020) から得、KS II<sup>+</sup> のBamH I 部位 (Stratagene, La Jolla, CA) 内に連結させる。このプラスミドは、KS II<sup>+</sup> HBpc/c と呼称される。Xho I リンカーをKS II<sup>+</sup> HBpc/c を、KS II<sup>+</sup> HBpc/c 内のプリコア/コアのStu I 部位 (ヌクレオチド配列1704で) に付加し、ひきつづきHinc II で分割を行なう (ヌクレオチド配列2592で)。結果として得られた877塩基対Xho I -Hinc II プリコア/コアフラグメントを、SK II<sup>+</sup> のXho I /Hinc II 部位内でクローニングさせる。このプラスミドはSK II<sup>+</sup> HBe と呼称される。

### B. PCRを利用する配列の調製

#### 1. PCRを利用したHBV e/コア配列の部位特異的突然変異誘発

プラスミドKS II<sup>+</sup> HBpc/c 中のプリコア/コア遺伝子を配列決定して、プリコア/コアコーディング領域が適正であるか否かを決定する。この配列は、コドン84及び85において2つの連続する枠内TAG停止コドンという結果をもたらすコドン79におけるフレームシフトをひき起こす単一塩基対欠失を有することがわかって、いる。この欠失は、プラスミドSK<sup>+</sup> HBe内のプリコア/コアコーディング領域のPCRオーバーラップ (重複) 拡張 (Ho. et al., Gene 77: 51, 1989) によって補正される。欠失を補正するべく行なわれる3回のPCR反応のためには、4つのオリゴヌクレオチドプライマーが使用される。

第1の反応は2つのプライマーを利用する。センスプライマー配列は、adw菌株のヌクレオチド配列1805～1827に対応し、5' 末端に2つのXho I 制限部位を含む。ヌクレオチド配列番号はGenbank (Intelligenics, Inc., Mountain View, CA) から得られる。

5'-CTC GAG CTC GAG GCA CCA GCA CCA TGC AAC TTT TT-3'

(配列番号51)

第2のプライマー配列は、B型肝炎ウイルスのadw菌株のアンチセンスヌクレ

オチド配列2158～2130に対応し、コドン79, 84及び85を含む。

5'-CTA CTA GAT CCC TAG ATG CTG GAT CTT CC-3'

(配列番号52)

第2の反応も同様に2つのプライマーを利用する。センスプライマーはadw菌株のヌクレオチド配列2130～2158に対応し、コドン79, 84及び85を含む。

5'-GGA AGA TCC AGC ATC TAG GGA TCT AGT AG-3'

(配列番号53)

第2のプライマーはSK<sup>+</sup>プラスミドポリリンカーからのアンチセンスヌクレオチド配列に対応し、HBVプリコア／コアコーディング領域の停止コドンより135bp下流にCla I 部位を含む。

5'-GGG CGA TAT CAA GCT TAT CGA TAC CG-3'

(配列番号54)

第3の反応は同様に2つのプライマーを利用する。センスプライマーはadw菌株のヌクレオチド配列5～27に対応し、5' 末端に2つのXho I 制限部位を含む。

5'-CTC GAG CTC GAG GCA CCA GCA CCA TGC AAC TTT TT

(配列番号55)

第2のプライマー配列は、SK<sup>+</sup>プラスミドポリリンカーからのアンチセンスヌクレオチド配列に対応し、HBVプリコア／コアコーディング領域の停止コドンより135bp下流にCla I 部位を含む。

5'-GGG CGA TAT CAA GCT TAT CGA TAC CG-3'

(配列番号56)

第1のPCR反応は、アンチセンス鎖内の欠失を補正し、第2の反応はセンス鎖内の欠失を補正する。PCR反応1及び2は、コドン79

内で起こるCCからCCAまでの突然変異及びコドン81内のTCAからTCTまでの塩基対置換を補正する。プライマー1は、HBVコーディング領域のATGコドンの上流10bpのところに2つの連続的Xho I 部位を含んでおり、プライマー4はHBVプリコア／コアコーディング領域の停止コドンより135bp下流のところにCla I 部位を含む

。第1及び第2のPCR反応の産物は、第3のPCR反応において拡張されて、正しい配列をもつ1つの完全なHBVプリコア／コアコーディング領域を生成する。

以下の循環条件を用いてPCR反応が行なわれる：最初に、試料を2分間94℃で加熱する。溶融ステップと呼ばれるこのステップは2本鎖DNAを合成のための1本鎖に分離する。次に試料を30秒間56℃で加熱する。アニーリングステップと呼ばれるこのステップはプライマーが第1段階で産生された1本鎖DNAまでアニールできるようにする。次に試料を30秒間72℃で加熱する。拡張ステップと呼ばれるこのステップは、第1段階で産生された1本鎖DNAの相補的鎖を合成する。第2の溶融ステップを30秒間94℃で行ない、その後に30秒間56℃でのアニーリングステップを行ない、これに続いて30秒間72℃での拡張ステップを行なう。その後、この手順を35サイクル反復し、望ましいDNA産物の増幅を結果として得る。

PCR反応産物を1.5%のアガロースゲル電気泳動によって精製し、NA45紙 (Schleicher and Schuell, Keene, New Hampshire) 上へ移す。400  $\mu$  l の高塩緩衝液 (1.5MのNaCl, 20mMのトリス、pH8.0、及び0.1mMのEDTA) の中で65℃で30分間インキュベートすることにより、望ましい787bp DNAフラグメントをNA45紙から溶出させる。溶出の後、500  $\mu$  l のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) を溶液に加える。混合物を渦流に付し、次にBrinkmann Eppendorf遠心分離器 (5415 L) 内で5分間14000rpm

で遠心分離する。望ましいDNAフラグメントを含む水相を新鮮な1.5mlのmicrofuge管に移し、100%のEtOHを1.0ml加える。この溶液を5分間ドライアイス上でインキュベートし、その後10000rpmで20分間遠心分離する。上清を傾瀉させ、ペレットを70%のEtOH 500  $\mu$  l で洗い流す。Savant Speed-Uac濃縮器の中で真空下10000rpmでの遠心分離によりペレットを乾燥させ、次に10  $\mu$  l の脱イオン水の中で再懸濁させる。PCR産物1マイクロリットルを、1.5%のアガロースゲル電気泳動により分析する。787 Xho I - Cla I - Cla I プリコア／コアPCR増幅フラグメントをSK<sup>+</sup>プラスミドのXho I - Cla I 部位の中にクローニングする。このプラスミドはSK<sup>+</sup>HBe-cと呼称される。E. coli (DH5 alpha, Bethesda Research Labs. Gaithersburg, MD) をSK<sup>+</sup>HBe-cプラスミドで形質転換させ増幅させてプラスミドDNA

を生成する。このプラスミドを次に、基本的にBirnböimが記述する通りに分離し精製する。(Nuc. Acid Res. 7:1513, 1979:分子クローニング:実験室マニュアル、Sambrook et al.(eds.), Cold Spring Harbor Press, 1989も参照のこと)。プリコア/コア遺伝子の配列を確認するためSK<sup>+</sup>HBe-cプラスミドを分析する(図4)。

## 2. HBVコア配列の分離

プラスミドSK<sup>+</sup>HBe中の単一の塩基対を、例9Bで記述されている通りPCRオーバーラップ拡張によって補正する。突然変異を補正するよう行なわれるPCR反応のため4つのオリゴヌクレオチドプライマーを使用する。

第1の反応は2つのプライマーを利用する。センスプライマーはSK<sup>+</sup>HBeプラスミドのT-7プロモーターのためのヌクレオチド配列に対応する。

5'-AAT·ACG·ACT·CAC·TAT·AGG·G-3'  
(配列番号57)

第2のプライマーは、adw菌株のアンチセンス配列2158~2130に対応し、コドン79, 84及び85を含む。

5'-CTA·CTA·GAT·CCC·TAG·ATG·CTG·GAT·CTT·CC-3'  
(配列番号58)

第2の反応は2つのプライマーを利用する。アンチセンスプライマーはSK<sup>+</sup>HBeプラスミドの中に存在するT-3プロモーターのためのヌクレオチド配列に対応する。

5'-3':ATT·AAC·CCT·CAC·TAA·AG  
(配列番号59)

第2のプライマーは、adw菌株のセンスヌクレオチド配列2130~2158に対応し、コドン79, 84及び85を含む。

5'-GGA·AGA·TCC·AGC·ATC·TAG·GGA·TCT·AGT·AG-3'  
(配列番号60)

第3の反応は2つのプライマーを利用する。アンチセンスプライマーは、SK<sup>+</sup>HBeプラスミドの中に存在するT-3プロモーターのためのヌクレオチド配列に対

応する。

5'-ATT AAC CCT CAC TAA AG-3'

(配列番号61)

第2のプライマーはSK' HBeプラスミド内に存在するT-7プロモーターのセンス配列に対応する。

5'-AAT ACG ACT CAC TAT AGG G-3'

(配列番号62)

第3の反応からのPCR産物は、HBVプリコア/コアコーディング領域についての正しい配列を生成する。

HBVコアコーディング領域を分離するため、コアコーディング領域のATG開始コドンの上流にXho I 制限部位を導入しHBVプリコー

ディング領域の29アミノ酸リーダー配列を削除するようにプライマーを設計する。第4の反応では、第3の反応からのPCR産物及び以下の2つのプライマーを用いてHBVコアコーディング領域を産生する。

センスプライマーは、adw菌株のヌクレオチド配列1885~1905に対応し、5'末端に2つのXho I 部位を含む。

5'-CCT CGA GCT CGA GCT TGG GTG GCT TTG GGG CAT G-3'

(配列番号63)

第2のプライマーは、SK' HBeプラスミド内に存在するT-3プロモーターのためのアンチセンスヌクレオチド配列に対応する。第4のPCR反応からの約600bpのPCR産物は5'末端にHBVコアコーディング領域及び新規のXho I 制限部位を、又SK' HBeプラスミドのマルチクローニング部位の中に存在した3'末端においてCla I 制限部位を、含んでいる。

5'-ATT ACC CCT CAC TAA AG-3'

(配列番号64)

第4のPCR反応の後、溶液を新鮮な1.5mlのmicrofuge管の中に移す。この溶液に3Mの酢酸ナトリウムを50マイクロリットル付加し、その後500 $\mu$ lのクロロホルム：イソアミルアルコール(24:1)を加える。混合物を渦流に付し、次に

5分間14000rpmで遠心分離する。新鮮なmicrofuge管に水相を移し、1.0mlの100%EtOHを付加する。この溶液を4.5時間-20℃でインキュベートし、その後20分間10000rpmで遠心分離する。上清を傾瀉し、ペレットを500 $\mu$ lの70%EtOHで洗い流す。真空下で10,000rpmで遠心分離によりペレットを乾燥させ、次に10 $\mu$ lの脱イオン水の中で再度懸濁させる。PCR産物を1マイクロリットル、1.5%のアガロースゲル電気泳動法により分析する。

### 3. HBV X抗原の分離

B型肝炎ウイルスX読取り枠を含む642bpのNC01-TaqIフラグメントを、pAM6プラスミド(adw) (ATCC 45020) から得、クレノウフラグメントにより平滑末端にし、SK<sup>+</sup>のHincII部位の中に連結させる(Stratagene, La Jolla, California)。

連結反応を用いてE. coli (DH5 $\alpha$ , Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD) を形質転換させ、増殖させる。次に、基本的にBirnboim et al. によって記述されている通りに(Nuc. Acid Res. 7:15134, 1979; 分子クローニング: 実験室マニュアル, Sambrook et al. (eds.) Cold Spring Harbor Press, 1989) ミニプレップDNAを分離し精製する。

このフラグメントはいずれの配向でも挿入できることから、SK<sup>+</sup> マルチクローニング部位の中のXhoI及びClaI部位に関してセンス配向を有するクローンが選択される。より特定の言うと、ミニプレップDNAを診断用制限酵素BamHIで消化させる。正しい配向でのインサートは、サイズが3.0kb及び0.6kbの2つのフラグメントを生み出す。正しくない配向でのインサートは、3.6kb及び0.74kbの2つのフラグメントを生み出す。正しい配向でのクローンが選択され、SK-XAgと呼称される。

### 4. HBVe-c, HBVコア及びHBV Xを発現するシンジスベクターの構築

HBVe-c配列を発現するシンジスベクターの構築は、HBVe-c配列をコードするcDNAフラグメントを放出するべくXhoI及びClaIの制限酵素部位でSK<sup>+</sup> HBe-cプラスミドを消化することによって達成される。このときフラグメントは、アガロースゲル電気泳動によって分離され、Gene Clean<sup>TM</sup> (BIO 101, San Diego, CA) で

精製され、Xho I 及び Cla I での消化によって調製され CIAP で処理された望

ましいシンドビスベクターバックボーンの中に挿入される。例 2 で記述したシンドビスベクターは、HBV 抗原配列の挿入に適している。このようなシンドビスベクターには、pKSSINBV, pKSSINd1JRsjrc, pKSSINd1JRsjrPC, pKSSINd1JRsjrNR (7582-7601) 及び pKSSINd1JRsexjr が含まれる。

HBV コア配列を発現するシンドビスベクターの構築は、上述の PCR 産物の Gene Clean<sup>TM</sup> 処理により達成される。このとき、増幅された産物は、Xho I 及び Cla I 制限酵素部位で消化され、アガロースゲル電気泳動で分離され、Gene Clean<sup>TM</sup> で精製され、Xho I 及び Cla I 酵素で予め処理された上述のものと同一シンドビスベクターの中に連結される。

〔HBV-X 抗原配列を発現するシンドビスベクターの構築は、HBV-X 配列をコードする cDNA フラグメントを放出するべく Xho I 及び Cla I 制限部位でプラスミド SK-XAg を消化することによって達成される。フラグメントは、アガロースゲル電気泳動により分離され、Gene Clean<sup>TM</sup> を用いて精製され、Xho I 及び Cla I 酵素で予備処理された前述の望ましいシンドビスベクターバックボーン内に挿入される。〕

上述のシンドビスの HBV 発現ベクターは同様に、ベクターに感染した細胞の実験又は処理の必要条件に応じて、選択可能な薬物耐性標識を同時発見するように修正することもできる。上述のシンドビス HBV 発現ベクターのいずれも、G418 耐性について同時発現するように設計することもできる。これは、ベクターの多重クローニング部位を用いてベクターの終端 3' 末端から 5' のところ及び HBV コーディング配列から 3' のところに置かれた細菌ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子が後につづく内部リボザイム侵入部位 (例 5) を取り込むことによって達成される。これらの G418 耐性

ベクター構成体は以下の節で HBV 特異的 CTL 標的の生成のためにベクター感染した細胞を選択するために使用することができる)。

#### D. シンドビスベクターに感染した細胞の発現

##### 1. ELISA

$1.0 \times 10^7$  個の培養細胞をPBSで洗浄し、PBS中で合計  $600 \mu\text{l}$  の量まで細胞を再懸濁させ、Branson音波処理機350型 (Fisher, Pittsburgh, PA) 内で30の設定値で2回5秒間音波処理するか又は3回凍結融解させることによって、HBV発現ベクターのいずれかによる感染を受けた細胞からの細胞リゼイトを作る。5分間10000rpmで遠心分離によりリゼイトを清澄させる。

細胞リゼイト中のコア抗原及びプリコア抗原及び培養上清中の分泌されたe抗原を、Abott HBe, rDNA EIAキット (Abbott Laboratories Diagnostic Division, Chicago, IL) を用いて検定する。細胞リゼイト中のプリコア抗原及び培養上清中の分泌されたe抗原のためのもう1回の感受性EIA検定を、Incstar ETI-EBIキット (Instar Corporation, Stillwater, MN) を用いて行なう。Biogen (Geneva, スイス) から得たe抗原及び組換え型B型肝炎コアの希釈物から標準曲線を生ずる。

これらの手順を用いて、トランスダクションを受けた細胞系統の中で約10ng/mlのe抗原が発現される。

## 2. 免疫沈降法/ウエスタンブロット法

ベクター感染細胞により発現されたプリコア/コア及びe抗原の特徴づけは、免疫沈降法とそれに続くウエスタンブロット法によって行なわれる。特定的に言うと、PBS又は培養上清中の0.5~1.0mlの細胞リゼイトを、G-セプテロース (Pharmacia LKB, Uppsala, スウェーデン) に結合されたポリクローナルウサギ抗B型肝炎コア抗原 (DAKO Corporations, Carpinteria, California) と混合し、

4℃で一晩インキュベートする。20mMのトリス-HCl, pH8.0, 100mMのNaCl, 10mMのEDTAの中で2度洗浄し、0.5%のβ2-メルカプトエタノールを含む試料投入緩衝液中で煮沸する。SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法によってタンパク質をまず分解し、その後Immobilon (Millipore Corp., Bedford, ME) へと移し、DAKOポリクローナルウサギ抗肝炎コア抗原とそれに続く $^{125}\text{I}$ -プロテインAで精査する。

## E. 免疫応答の試験

### 1. 細胞障害性検定



## (a) 近交系マウス

照射された（室温で10000ラド） $1 \times 10^7$ 個のシンドビスベクターの感染を受けたL-M (TK<sup>-</sup>)細胞 (ATCC, CLL-1.3)を1週間の間隔で2回、生後6週間～8週間の雌のBalb/C, C57B1/6及びC3Hマウス (Harlan, Sprague Dawley, Indianapolis, IN)に腹腔内 (ip) 注射する。7日後に動物を安楽死させ、脾細胞 ( $3 \times 10^6$ /ml)をT-25フラスコ (Corning, Corning, NY)の中でそのそれぞれの照射されたシンドビスベクター感染細胞 ( $6 \times 10^4$ /ml)と共にインビトロで培養する。培地は、RPMI1640, 5%の熱不活性化ウシ胎児血清、1mMのピルビン酸ナトリウム、 $50 \mu\text{g/ml}$ のゲンタマイシン及び $10^{-5}$ Mの $\beta$ -2-メルカプトエタノール (Sigma, St. Louis, MO)から成る。4～7日後にエフェクタ細胞を収穫し、標準的クロム放出検定において96ウェルのマイクロタイタープレート (Corning, Corning, NY)の中でさまざまなエフェクタ：標的細胞比を用いて試験する。標的は、ベクター感染した及びベクター感染していないL-M (TK<sup>-</sup>)細胞であり、一方トランスダクションを受けていない細胞系統が負の対照として使用される。特定の言くと、 $200 \mu\text{l}$ の最終体積内でさまざまなエフェクタ対標的細胞比で、 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$

で標識付けされた (Amersham, Arlington Heights, IL) ( $100 \mu\text{Ci}$ ,  $37^\circ\text{C}$ で1時間) 標的細胞 ( $1 \times 10^4$ 細胞/ウェル)をエフェクタ細胞と混合する。インキュベーションの後、 $100 \mu\text{l}$ の培地を除去し、Beckmanガンマ分光計 (Beckman, Dallas, TX)の中で分析する。標的と培地からのCPMとして自然的放出 (SR)を決定し、標的と1MのHClからのCPMとして最大放出 (MR)を決定する。標的細胞溶解百分率を、 $[(\text{エフェクタ細胞} + \text{標的CPM}) - (\text{SR}) / (\text{MR}) - (\text{SR})] \times 100$ として計算する。標的の自然放出値は、標準的にはMRの10%～20%である。

いくつかのCTL検定のためには、エフェクタは、例えば一次インビトロ刺激の後8～12日目といったように何回もインビトロ刺激を受けることができる。より特定の言くと、照射された (10000ラド)  $6 \times 10^5$ 個の刺激体細胞と、照射された (3000ラド) の $2 \times 10^7$ 個の「フィーラー」細胞 (以下で記述する通りに調製したもの) と $10^7$ のエフェクタ細胞を、10mlの「完全」RPMI培地の中で混合する

。(RPMIは以下のものを含む：5%の熱不活性化ウシ胎児血清、2mMのL-グルタミン、1mMのピルビン酸ナトリウム、1X可欠アミノ酸、及び $5 \times 10^{-5}$  Mの $\beta$  2-メルカプトエタノール)。エフェクター細胞のインビトロ刺激のための刺激体細胞を、G418耐性と同時発現するシンドビスHBVベクターを用いてL-M<sup>+</sup>(TK<sup>-</sup>)細胞を感染させることで生成する。2週間G418を800  $\mu$ g/ml用いて標識選択のため、ベクター感染細胞を選択する。G418耐性細胞を次に10000ラドで照射し、次に記述したとおりエフェクタ細胞を再度刺激するためにこれを用いる。室温で3000ラドで照射を受け、RPMI内で再懸濁させた、特定の投薬を受けたことのない同系のマウス脾細胞から「フィラー」細胞を調製する。脾細胞をRPMIで洗浄し、5分間室温で3000rpmで遠心分離し、ペレットをRPMI内で再懸濁する。再懸

濁した細胞を3～5分間37℃で1.0mlのトリス-塩化アンモニウム(100mlの0.17Mのトリスベース、pH7.65、と900mlの0.155MのNH<sub>4</sub>Cl；最終溶液のpHは7.2に調整する)で処理する。その後二次インビトロ再刺激物を、CTL検定における試験の前に5～7日間培養する。2～10Uの組換え型ヒトIL-2(200U/ml、カタログ#799068, Boehringer Mannheim、西ドイツ)を付加しながら、前述のとおり、その後の全ての再刺激物を培養する。

これらの手順を用いて、CTL-HBVe抗原の誘発が可能であることを示すことができる。

#### (b) HLA A2.1トランスジェニックマウス

照射され(室温で10000ラド)、ベクタートランスダクションを受けた $1.0 \times 10^6$ のEL4 A2/K<sup>b</sup>細胞(ATCC No. TIB-39)を1週間の間隔をおいて、生後6～8週間の雌のHLA A2.1トランスジェニックマウス(V. Engelhard, Charlottesville, VA)に2回腹腔内(i.p.)投与する。7日後に動物を安楽死させ、脾細胞( $3 \times 10^6$ /ml)を、フラスコ(T-25, Corning, Corning, NY)内で、照射済み(10000ラド)でトランスダクションを受けたJurkat A2/K<sup>b</sup>細胞又はペプチドコーディングされたJurkat A2/K<sup>b</sup>細胞( $6 \times 10^4$ /ml)と共にインビトロで培養する。クロム放出検定の残りの部分は、標的がトランスダクションを受けた及び受けていないEL4 A2/K<sup>b</sup>及びJurkat A2/K<sup>b</sup>細胞である例9E 1. a. の中で記述されている通り

に行なわれる。トランスダクションを受けていない細胞系統が、負の対照として利用される。

標的は同様に、ペプチドコーディングを受けたEL4 A2/K<sup>b</sup>細胞であってもよい。

(c) ベクター構成体でのヒトの細胞のトランスダクション

B95-8, EBV形質転換マルモセット白血球(ATCC CRL 1612)の3週間培養の上清から取った新鮮なエプスタイン-バーウイルス(EBV)でそのB細胞を感染(形質転換)させることにより、各患者についてリンパ芽球様細胞系統(LCL)を樹立する。EBV形質転換から3週間後に、HBVコア又はe抗原及びG418耐性を発現するシンドビスベクターでLCLを感染させる。4.0mlの培地を含む6 cmのプレート中で $1.0 \times 10^6$ 個の照射済み(10000ラド)シンドビスベクター生産者細胞と $1.0 \times 10^6$ のLCL細胞を同時培養すること又はfectiousベクター上清を付加することによってLCLのベクター感染を達成する。培地は、RPMI1640, 20%の熱不活性化ウシ胎児血清(Hyclone, Logan, UT), 5.0mMのピルビン酸ナトリウム及び0.5mMの可欠アミノ酸から成る。37℃及び5%のCO<sub>2</sub>での一晩の同時培養後、LCL懸濁細胞を、照射済み(10000ラド)シンドビスベクター生産者細胞から除去する。感染したLCL細胞を、800  $\mu$ g/mlのG418を付加することによって選択する。基本的にLCL細胞の感染について記述した通りに、Jurkat A2/K<sup>b</sup>細胞(L. Sherman, Scripps Institute, San Diego, CA)を感染させる。

(d) ヒトCTL検定

フィコール比重差遠心分離(Sigma, St. Louis, MO)により、ヒトPBMCを分離する。特定の言うと、5分間室温で3000rpmで細胞を遠心分離させる。PBMCをインビトロでその自己トランスダクションを受けたLCL(例9E, 1. c.)を用いて10日間、10:1のエフェクター:標的比で再刺激させる。培地は、5%の熱不活性化されたウシ胎児血清、1mMのピルビン酸ナトリウム及び50  $\mu$ g/mlのゲンタマイシンの予備スクリーニングされたロットを伴うRPMI1640から成る。結果として得られた刺激を受けたCTLエフェクターを、標準クロム放出検定(例9E, 1. a.)内で標的として感染した自己由来のLCL又はHLA整合細胞を用いて、CTL活性につい

て試験する。大部分の細胞は、EBV特異的CTLにより標的細胞として認識され、

患者はEBVに対する免疫を有することから、負の対照として使用されるトランスダクションを受けていないEBV形質転換されたB細胞（LCL）も同様に、トランスダクションを受けたLCLと共にEBV特異的CTLにより標的として認識されることになる。EBV特異的CTLによる標識付けされた標的細胞の死滅による高いバックグラウンドを低減させるため、50：1の比で、標識付けされた標的細胞に対して標識付けされておらずトランスダクションを受けていないLCLを付加することが必要である。

## 2. 体液性免疫応答の検出

HBVコア及びe抗原に特異的なマウス内の体液性免疫応答をELISAにより検出する。ELISAプロトコルは、96ウェルのプレートをコーディングするため、100  $\mu$ g /ウェルの組換え型HBVコア及び組換え型HBV e抗原(Biogen, Geneva, スイス)を利用する。次に、HBVコア又はHBV e抗原を発現する細胞又は直接ベクターで免疫化されたマウスからの血清を、抗原コーディングされたウェル内にて段階希釈し、室温で1～2時間インキュベートする。インキュベーションの後、同等の力価をもつウサギ抗マウスIgG1, IgG2a, IgG2b及びIgG3の混合物をウェルに付加する。各々のウェルにホースラディッシュペルオキシダーゼ（「HRP」）に結合されたヤギ抗ウサギ抗血清を付加し、試料を室温で1～2時間インキュベートする。インキュベーションの後、適切な基質を付加することにより反応性を視覚化する。HBVコア又はHBV e抗原に特異的なIgG抗体を含むウェルの中で、発色が見られる。

## 3. T細胞増殖

HBVコア又はe抗原を発現する直接ベクター調製物の2回又は3回の注入の結果得られる抗原誘発されたTヘルパー活性をインビトロで測定する。

特定の言うと、免疫化されたマウスからの脾細胞を、負の対照としてHBVコア又はe抗原を発現しない細胞を又はHBVコア又はe抗原を発現する細胞を用いて、予め定められた比率でインビトロで再刺激する。5%のFBS, 1.0mMのピルビ

ン酸ナトリウム及び $10^{-5}$ の $\beta$ 2-メルカプトエタノールを含むRPMI1640培地中の5%の $\text{CO}_2$ 及び37℃で5日間経過した後、上清をIL-2活性について試験する。HBVコア又はe抗原により刺激されたTヘルパー細胞によって特異的にIL-2が分泌され、CTLクローン、CTLL-2 (ATCC TIB 214) を用いてその活性を測定する。簡単に言うと、CTLL-2クローンは成長に関しIL-2に依存しており、IL-2が無い場合増殖しない。96-ウェルのプレート内で上清試料の段階希釈物に対してCTLL-2細胞を付加し、3日間37℃で5%の $\text{CO}_2$ にてインキュベートする。その後、CTLL-2細胞に $0.5\mu$ の $\text{Ci}^3\text{H}$ -チミジンを付加する。CTLL-2細胞が増殖する場合にのみ、 $0.5\mu$ の $\text{Ci}^3\text{H}$ -チミジンを取り込む。一晩インキュベートした後、細胞をPHD細胞収穫装置 (Cambridge Technology Inc., Watertown, MA) を用いて収穫し、Beckmanベータ-計数器で計数する。試料中のIL-2の量を、Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN) から得た組換え型IL-2標準から生成された標準曲線から決定する。

## F. 投与プロトコル

### 1. マウス

#### (a) 直接ベクター投与

HBVコア又はe抗原をコードするベクターの直接投与による体液体及び細胞媒介型の免疫応答の誘発を評価するのに、マウス系を用いることも可能である。簡単に言うと、(無菌の脱イオン精製水で)再構成された凍結乾燥されたHBVコア又はHBVeを発現するシンドビスベクター0.1mlを、生後6~8週間の雌のBalb/c C57B16又は

C3Hマウスに筋肉(i.m.)注射する。1週間離して2回の注射を行なう。2回目の注射から7日後に、動物を安楽死させる。その後、基本的に例9E 1aに記述されている通りにクロム放出CTL検定を行なう。

### 2. チンパンジー投与プロトコル

B型肝炎ウイルスに慢性的に感染したチンパンジーの体内にベクターを投与するプロトコルを決定するために、上述のマウス系で生成されたデータを使用する。マウス体内でのHBV特異的CTLの誘発に基づいて、チンパンジー試験の被験動物

は、2つの連続的に上昇する用量のグループで与えられる28日間隔でのコア又はe抗原をコードするベクターの3回の用量を受けることになる。対照被験動物は、HBV-IT(V)融合媒質から成るプラシーボを受ける。用量は、注射日毎に0.5ml×4回の筋肉注射で与えられる $10^6$ 又は $10^7$ のいずれかのHBV-IT(V)cfuである。血清アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)レベル、B型肝炎e抗原の存在、B型肝炎e抗原に対して導かれた抗体の存在を測定し治療の安定性及び許容度を評価するため、4日目、12日目、24日目、36日目、52日目、70日目及び84日目及び6ヵ月目、12ヵ月目、18ヵ月目、24ヵ月目、30ヵ月目及び36ヵ月目に血液試料を採取する。Abbott HBe rDNA EIAキット (Abbott Laboratories Diagnostic Division, シカゴ、IL) により、B型肝炎e抗原及びHBe抗原に対する抗体を検出する。B型肝炎コア又はe抗原に対するCTLの誘発の効率を、例9E 1cにある通りに決定することができる。

チンパンジー研究からの安定性及び効力の結果に基づいて、人体試験における患者に対するベクター投与のために、用量及び接種スケジュールを決定する。これらの患者は、血清ALTレベル、HBV e抗原の存在及びHBV e抗原に対して導かれた抗体の存在について、

例9E 1cにある通りに決定される。

基本的に前述のとおり監視される。B型肝炎コア又はe抗原に対するヒトCTLの誘発は、例9E 1.Cにあるとおりに決定される。

### 例12

#### 免疫応答の誘発又はウイルス宿主細胞相互作用の遮断のためのウイルスタンパク質を発現するシンドビスベクター

以下の例は、HIVウイルス抗原を発現することにより免疫応答を生成することのできるシンドビスベクターを構築するための手順を記述するものである。免疫応答の誘発及び発現を試験する方法も同様に示されている。

#### 免疫応答を惹起するために用いられるシンドビスベクター

##### A. HIV III B ENN発現ベクター

HIVプロウイルスクローンBH10-R3(配列については、Ratner et al., Nature 313 : 277, 1985参照)から2.7kbのKpn-I-Xho I DNAフラグメントを分離し、III exE

7diltaenv (nt: 5496に対するBal31欠失) からの~400bp Sal I - Kpn I DNAフラグメントを、プラスミドSK'中のSal I 部位の中に連結された。このクローンから、3.1kbのenv DNAフラグメント (Xho I - Cla I) を精製し、前述したXho I 及びCla I で予備消化されたシンドビスベクターの中に連結させた。

#### B. HIV特異的抗原を発現する生産者細胞系統の作成

上述のベクターから誘導されたHIV III B envを発現するベクター産生細胞系統を構築するために、シンドビスパッケージング細胞系統の中でインキュベート転写されたRNA写しをトランスフェクションする (例7)。特定の言う、HIV特異的配列をコードするcDNAシンドビスベクタークローンから転写するのに用いられるSP6インキュベート転写RNAポリメラーゼ系を用いて、シンドビスRNAベクター分子を最初に産生する。その後、生成されたインビトロRNA

ベクター産物を、24時間以内で過渡的感染性ベクター粒子の産生を導くシンドビスパッケージング又はホッピング細胞系統の中にトランスフェクションする。このとき、これらのベクター粒子を細胞系統培養の上清から収集し、次に0.45ミクロンのフィルタを通してろ過して細胞汚染を防ぐ。その後ろ過した上清を用いてシンドビスパッケージング細胞の新鮮な単層を感染させる。感染から24時間以内に、シンドビス非構造タンパク質及びHIV特異的配列をコードするポジティブ鎖のシンドビス組換え型RNAを含むシンドビスベクター粒子が産生される。

シンドビスHIV III B envベクターの代替的形態は、選択可能な標識を含むプロモーター駆動のcDNAシンドビス構成体である。この形態では、特異的HIV III B env配列を含む上述のXho I - Cla I フラグメントは、バクテリオファージポリメラーゼ認識配列に代わって、構成体プロモーターにより駆動される類似のcDNAシンドビスベクターの中に置かれる。この形態を使用すると、発現ベクタープラスミドはパッケージング細胞系統内へトランスフェクションされ、トランスフェクションから24~48時間後に薬物耐性遺伝子について選択される。このとき、(使用される選択標識に応じて) 14日後に耐性コロニーをプールし、希釈クローニングする。次に、いくつかの希釈クローンを増殖させ、最高のベクター力価について検定する。その後最高の力価のクローンを膨張させ、凍結乾燥する。保存したク

ローンを、HIV特異的タンパク質の産生及び免疫応答の誘発について試験する。

### C. HIV特異的タンパク質の産生及び免疫応答についての試験

ウエスタンブロット分析により、HIV特異的タンパク質の産生について、シンドビスHIV産生者細胞系統からの細胞リゼイトを試験する。インビトロで発現をトランスファするベクターの能力を試験

するためには、ウイルスベクターを含むろ過された上清でBHK-21細胞を感染させ、感染から24時間後にウエスタンブロット分析法により検定する。タンパク質発現がひとたび確認されたならば、ベクター処理後の外来性抗原を発現する同系の細胞がもつ、(a) 感染した同系細胞又は感染性ベクターの調製物のいずれかを注入することによりマウス体内でCTL応答を惹起する能力；(b) ヒトインビトロ培養系内でCTL応答を惹起する能力及び(c) 一次細胞を含めヒト、チンパンジー及びマカク細胞を感染させ、かくしてこれらをCTL応答の惹起に利用できるようにしかつCTL検定において標的とし役立ちうるようにすることができる能力、そして(d) 免疫応答エピトープをマッピングする能力、そして(e) マウスCMV(MCMV)といったようなその他の非HIV抗原に対するCTL応答を惹起し測定する能力、を実証するため、インビボでのマウス及び霊長類の研究を行なうことができる。

#### 1. シンドビスウイルスベクターでコードされる抗原に対する免疫応答

シンドビスHIV IIIB envベクターでのトランスダクションを受けた細胞系統から惹起された免疫応答を試験するため、HIV IIIBベクターを支持する組換え型シンドビスウイルスで、マウス腫瘍細胞系統(B/C 10ME) (H-2<sup>d</sup>) (Patek et al., Cell Immunol. 72:113, 1982)を感染させる。その後、同系(すなわちMHCが同一の) Balb/c (H-2<sup>d</sup>) マウスの体内でHIV env特異的CTLを刺激するべく、HIV env発現細胞系統(B/C 10ME-IIIB)を利用した。B/C 10ME-IIIB細胞(1×10<sup>7</sup>細胞)を腹腔内注射してマウスを免疫化し、7~14日目に追加免疫する(追加免疫が必要とされない場合もある)。これらの免疫化されたマウスから応答体脾細胞懸濁液を調製し1:50という刺激体:応答体細胞比にて、B/C 10ME-IIIB(B Cen



v)又はB/C 10ME (BC) のいずれかのマイトマイシン処理済み細胞の存在下で、4日間インビボで細胞を培養する。これらの培養からエフェクター細胞を収穫し、計数し、標準的な4～5時間の $^51\text{Cr}$ -放出検定においてさまざまなエフェクター: 標的 (E: T) 細胞比で放射性標識付け ( $^51\text{Cr}$ ) された標的細胞 (すなわちB/C 10ME env-29又はB/C 10ME) と混合させる。インキュベーションの後、マイクロタイタープレートで遠心分離し、 $100\mu\text{l}$  の培養上清を除去し、Beckmanガンマ分光計で溶解した細胞から放出された放射性標識の量を数量化する。標的細胞溶解は以下のとおり計算された: 標的細胞溶解% =  $\frac{\text{Exp CPM} - \text{SP CPM}}{\text{MP CPM} - \text{SR CPM}} \times 100$ 。なお式中、分あたりの実験的計数 (Exp CPM) はエフェクタープラス標的を表わし、自然放出 (SR) CPMは標的単独を表わし、最大放出 (MR) CPMは1 MのHC1の存在下での標的を表わす。

## 2. 組換え型シンドビスベクターの直接注入によるマウス体内免疫応答の刺激

マウス体内の直接注入の後のHIV外被タンパク質の発現を誘発する組換え型シンドビスウイルスベクターの能力を評価するために、実験を行なう。HIV IIIB envベクター構成体を支持する約 $10^4 \sim 10^5$  (pfu) の組換え型シンドビスウイルスを、腹腔内 (i. p.) 又は筋肉 (i. m.) 経路のいずれかで3週間間隔で2回注射する。このシンドビスウイルスの量は、免疫応答を刺激するものとみなされている量よりも低くなるように決定される。2回目のベクター注射から約7～14日後にCTL用に脾細胞を前処理する。

## D. 組換え型シンドビスベクターから発現されたウイルスタンパク質類似体から誘導された遮断薬

数多くの感染性疾患、ガン、自己免疫疾患及びその他の疾病には、細胞とウイルス粒子、細胞と細胞、又は細胞と因子の相互作用が

関与している。ウイルス感染においては、ウイルスは一般に感受性細胞の表面上のレセプタを介して細胞内に入る。ガンでは、細胞はその他の細胞又は因子からのシグナルに対し不適切にしか又は全く応答できない。自己免疫疾患の場合、「自己」標識の不適切な認識が存在する。これらの相互作用は、インビボで1つの

相互作用の中のいずれかのパートナーに対する類似体を産生することによって、遮断されうる。

この遮断作用は、細胞内、細胞膜上又は細胞外で起こり得る。遮断薬のための遺伝子を支持するウイルスの又は特にシンドビスのベクターの遮断作用は、感受性細胞の内側から又は病原性相互作用を局所的な遮断するべく遮断タンパク質の一変形態様を分泌することによって媒介されうる。

HIVの場合、相互作用の2つの作用物質は、gp 120/gp 41外被タンパク質及びCD4レセプタ分子である。かくして、適切な遮断物は、病原性効果をひき起こすことなくHIVの侵入を遮断するHIV env類似体が又はCD4レセプタ類似体のいずれかを発現するベクター構成体となる。CD4類似体は、隣接する細胞を防御するように分泌され機能するが、一方gp 120/gp 41はベクター含有細胞のみを防御するよう細胞内でのみ分泌又は産生される。安定性又は補体溶解を増強するためには、ヒト免疫グロブリン重鎖又はその他の構成要素をCD4に付加することが有利であるかも知れない。このようなハイブリッド-可溶性CD4をコードするレトロウイルスベクターの宿主への送り出しは、安定したハイブリッド分子の連続的供給という結果をもたらす。

HIV env類似体の発現を導くベクター粒子も同様に、上述のとおり構築することができる。どの部分が、明白な病原性の副作用なくウイルス吸着を遮断することができるかは、当業者にとって明らかである。

かなことである(Willy et al., J. Virol. 62 : 139, 1988 ; Fishen et al., Science 233 : 655, 1986)。

### 例13 シンドビスベクターを用いた遺伝子治療

全身的タンパク質産生のための組換え型シンドビスベクターを用いる置換遺伝子療法・ゴーシェ病のための治療法

#### A. グルコセレブロシダーゼシンドビスベクターの作製

cDNAコーディング配列の5'にXho I 制限酵素部位を、又cDNAコーディング配列の3'にCla I 制限酵素部位を含むグルコセレブロシダーゼ (GC) cDNAクローンをまず最初に生成する。このクローンは、Nco I でpMFG-GC (Ohashi et al., PN

AS 89:11332, 1992)を消化することによって生成させ、Vent DNAポリメラーゼ (New England Biolabs, Beverly, MA) で平滑末端化し、次にXho I リンカーに連結させることのできるものである。その後、このプラスミドはBamH Iで消化され、Vent DNAポリメラーゼで平滑末端化され、その後Cla I リンカーに対し連結される。その後、フラグメントをXho I 及びCla Iで消化させ、望ましいシンドビスベクターのXho I - Cla I 部位の中に連結させる。

#### B. シンドビスGCベクター産生細胞系統の構築

使用されたシンドビスcDNAベクタークローンに応じて、生産者細胞系統を作り出すため2つのアプローチが提示される。1つのタイプのシンドビスベクターは、複製応答能あるインビトロRNA写しの産生のためにSP6 RNAポリメラーゼ認識配列を使用する。このタイプのベクターは、パッケージング細胞系統内で持続的に複製することになる非組込みベクターに基づいてベクター生産者細胞系統を作り出すのに使用される。第2のタイプのベクターは、パッケージング細胞系統内で安定した組込みができるようになっているプラスミド構成体の中の非相同プロモーター (例7)を使用する。このとき、複製応答能あるベクター写しが、トランスフェクションを受けたパッケージング細胞系統内に転写される。

シンドビスGCウイルスベクターがSP6 RAN認識配列を使用する場合、まず最初に、市販のインビトロ転写系のいずれかを用いて (Megascript<sup>TM</sup> 転写キット: Ambion Inc., Austin, TX) cDNAをインビトロで転写させ、その後シンドビスパッケージング細胞系統へのリポソーム又はリン酸カルシウム沈降による全長RNA写しのトランスフェクションを行わなくてはならない。前述のとおり、次に、その後ウイルスベクター供給源として役立つシンドビスパッケージング細胞の新鮮な単層を再度感染させるために、トランスフェクションを受けたパッケージング細胞系統からの感染性ベクター粒子を含むろ過済み上清を使用する。10cmの皿の中で  $5 \times 10^6$  個の細胞を感染させるのに約10mlの感染性上清を使用しなくてはならない。

シンドビスGCウイルスベクターが、選択可能な標識 (ネオマイシン耐性遺伝子

）を伴う発現プラスミド形態の中で非相同プロモーターを使用する場合、cDNAベクターを、パッケージング細胞系統内にトランスフェクションして、その後薬物耐性選択を行わなくてはならない。このとき耐性あるコロニーをプールし希釈クローニングする。次に個々のクローンを増幅させ、凍結させる。クローンを高力価、ウェスタンブロット分析法によるGCの発現及びタンパク質の機能的活性について、個別にスクリーニングする。

選択可能な標識をもたないベクターについては、安定した形で又は持続的にトランスフェクションを受けたクローンの選択は、シンドビスベクターで細胞をトランスフェクションしてから1日～2日後に、DAトランスダクションを受けた細胞を希釈クローニングすることによって行なわれなくてはならない。このとき、伝令RNAの逆転写を用いることによって希釈クローンをGCの存在についてスクリーニングし、その後ポリメラーゼ連鎖反応技術によりcDNAメッセージの増幅を行なう。この手順はRT-PCR技術として知られ、Invitrogen Corp. (San Diego, CA) からこの検定を行なうための市販キットが入手できる。RT-PCRは、少なくとも10日間増幅させたクローンについて行なわれる。安定して持続的に感染を受けたクローンの適正な数を見い出すため、約50～100のクローンがスクリーニングされる。RT-PCRを行なうため、望まれるメッセージがRNA産物の増幅によってスクリーニングされるように特定のプライマーが必要とされる。GCスクリーニングのために521塩基対産物を増幅するよう設計されたプライマーは以下のようなものである：

GCスクリーニングのためのプライマー：

GC PCRプライマー #1:5'-TTT CTG GCT CCA GCC AAA GCC ACC CTA

GGG GAG-3' (配列番号69)

GC PCRプライマー #2:5'-AAT GGA GTA GCC AGG TGA GAT TGT CTC

CAG GAA-3' (配列番号70)

次に最高の発現及び力価を示すクローンをBHK-2細胞上への発現のトランスファについて試験し、その後GC活性についてウェスタンブロット分析法及び機能的検定を行なう。ウェスタンブロット分析法のためには、タンパク質の存在を決定

するのにヒトGCに対する特異的モノクローナル抗体(8E4)が使用される (Ohashi et al., PNAS 89:11332, 1992; Barneveld et al. Eur. J. Biochem. 134:310, 1983)。Corell et al. (Blood 80:331, 1992) により記述されている通りGC酵素活性を試験する。適当なクローンがひとたび同定されると、動物による研究を実施する。

#### 例14

##### 組換え型シンドビス粒子の投与

半ピボプロトコルで自己由来のCD34<sup>+</sup>細胞をトランスダクション

するか又は患者の骨髓にベクターを直接注入することにより、ゴースェ病の治療のために使用された(例13)治療用シンドビスベクターを投与することができる。組換え型多価ベクターからのGCの最長の治療的発現を達成するため、最良の投与様式は、例えば単球又はマクロファージといった臨床的に作動させられた細胞タイプの長命細胞前駆物質をトランスダクションすることにある。作動させられた細胞タイプの最も早期の前駆物質をトランスダクションすることにより、細胞前駆物質は、自己更新し、成熟GC陽性細胞で抹消血を再増殖させることができる。今日までに研究されてきた最も早期の多能性造血基幹細胞は、健康な骨髓集団の1%~4%又は抹消血集団の0.1%を構成するCD34<sup>+</sup>細胞である。CD34<sup>+</sup>細胞をトランスダクションできるということは、単球/マクロファージ系列についてのみならず治療用タンパク質にターゲティングされているあらゆる造血細胞にとって長期にわたる発現を支持する上で重要である。CD34<sup>+</sup>細胞をトランスダクションするための2つのアプローチとして、半ピボ及びインピボプロトコルがある。インピボプロトコルは、患者の骨髓の中にベクターを直接注射することにより骨髓細胞の無差別集団をトランスダクションすることに焦点をあてている。半ピボプロトコルは、患者の骨髓又は乳児患者のさい帯血からCD34<sup>+</sup>陽性基幹細胞を分離すること、ベクターで細胞をトランスダクションすることそしてその後自己由来細胞を患者に注射し戻すことに焦点をあてている。両方のアプローチ共実施可能であるが、半ピボプロトコルは、CD34<sup>+</sup>細胞の特定の培養された集団をトランスダクションすることによりベクターを最も効率良く使用できるようにする。半

ビボ方法の詳細を以下の節で記す。

#### 多価GCシンドビスベクターの半ビボ投与

技術に習熟した医師によって行なわれた注射器吸引により、患者

の骨髓からCD34<sup>+</sup>細胞を収集する。代替的には、患者が生まれる前に診断を受けた場合には乳児のさい帯血からCD34<sup>+</sup>細胞を得ることもできる。一般には骨髓がCD34<sup>+</sup>細胞の供給源である場合、局部又は全身麻酔下で後腸骨稜から又は大髄骨幹を穿刺することによって、20の骨髓吸引物が得られる。このとき、骨髓吸引物をプールし、1 mlにつき100ユニットのヘパリンと100  $\mu$ g/mlのデオキシリボヌクレアーゼ I を含むヘルペス緩衝されたハंकス平衡塩類溶液の中で懸濁させ、次にフィコール比重差遠心分離に付す。その後バッフィーコーディングを受けた骨髓細胞を収集しCell ProのCEPRATE<sup>™</sup> LC (Cell Pro, Bothell, WA) (CD34) 分離システムに従って洗浄する。その後、洗浄済みのバッフィーコーディングを受けた細胞を、順次抗-CD34モノクローナル抗体で染色し、洗浄しその後CEPRATE<sup>™</sup> システムと共に供給されたビオチニル化された二次抗体で染色する。それから細胞混合物をCEPRATE<sup>™</sup> アビジンカラム上に投入する。ビオチン標識付けされた細胞はカラム上に吸着されるが、一方標識付けされていない細胞は通過する。その後CEPRATE<sup>™</sup> システムの指針に従って洗い流し、ゲル床を手で圧搾することによりカラムの攪拌でCD34<sup>+</sup>細胞を溶出させる。CD34<sup>+</sup>細胞がひとたび精製されると、精製された基幹細胞を計数し、20%のプールされかつ熱不活性化されていないヒトAB血清 (hAB血清) を含むIscoreの修正ダルベッコ培地 (JMDM; Irvine Scientific, Santa Ana, CA) 中で $1 \times 10^5$  細胞/mlの濃度で平板培養する。

精製の後、(?) 精製された基幹細胞をトランスダクションするいくつかの方法を実施することができる。1つのアプローチには、ベクター産生細胞から誘導された上清培養を含むベクターを用いた精製基幹細胞集団の即時トランスダクションが関与している。第2のアプローチには、非粘着CD34<sup>+</sup>細胞の精製された集団との、ベク

ター産生細胞の照射済み単層の同時培養が関与している。第3のそして好ましい

アプローチには類似の同時培養アプローチが関与しているが、精製されたCD34<sup>+</sup>細胞はさまざまなサイトカインで予め刺激を受け、照射済みのベクター産生細胞との同時培養より48時間前に培養される。最近の出版物によると、レトロウイルスベクターを用いて細胞のトランスダクションに先立ち基幹細胞を予め刺激すると、これらの細胞タイプへの遺伝子トランスファのレベルが上昇するということが実証されている。(Nolta et al., Exp. Hematol. 20:1065, 1992)。トランスダクションレベルの上昇は、効率の良いレトロウイルストランスダクションに必要な基幹細胞の増殖の増大のせいである。シンドビスベクターは、複製しない細胞を感染させることができることから、これらの細胞の予備刺激は、必要でないかもしれない。しかしながら増殖をひき起こすこれらの培養の予備刺激は、患者の体内への返血のために増大した細胞集団を提供することになる。

CD34<sup>+</sup>細胞の予備刺激は、IL-1, IL-3, IL-6 及び肥満細胞成長因子(MGF)を含む成長因子及びサイトカインの組合せを用いて細胞をインキュベートすることによって行なわれる。予備刺激は、48時間、骨髓刺激培地を含むT25組織培養フラスコ内で培地1mlにつき1~2×10<sup>5</sup>のCD34<sup>+</sup>細胞を培養することによって行なわれる。骨髓刺激培地は、30%の熱不活性化されていないhAB血清、2mMのL-グルタミン、0.1mMのβ2-メルカプトエタノール、1μMのヒドロコルチゾン及び1%の脱イオンウシ血清アルブミンを含むIMDMから成る。骨髓培養の中で用いられる全ての試薬は、顆粒球、赤血球、マクロファージ、巨核球、正常な骨髓からのコロニー形成ユニットを最大数支持するその能力についてスクリーニングされなくてはならない。予備刺激のための精製された組換え型ヒトサイト

カイン及び成長因子(Immunex Corp., Seattle, WA)は、おつぎの濃度で使用するべきである:E. coli由来のIL-1α(100U/ml)、酵母由来のIL-3(5ng/ml)、IL-6(50U/ml)及びMGF(50ng/ml)(Anderson et al., Cell Growth Differ. 2:373, 1991)。

CD34<sup>+</sup>細胞の予備刺激の後、これらの細胞は、連続的に刺激培地が存在する状態で、照射済みのシンドビス生産者細胞系統(GC治療用ベクターを発現するもの)との同時培養により感染を受ける。DAベクター産生細胞系統はまずトリプシン

処理され、照射(10000ラド)を受け、骨髓刺激培地1mlあたり $1 \sim 2 \times 10^5$ 個の細胞の割合で再度平板培養される。翌日、シンドビスベクター産生細胞単層に対して、 $1 \sim 2 \times 10^5$ 個の予備刺激されたCD34<sup>+</sup>細胞/mlを付加する。細胞の同時培養は、48時間行なう。同時培養の後、培地で勢いよく洗浄することによって粘着性シンドビスベクター産生細胞単層からCD34<sup>+</sup>細胞を収集し、移動したベクター産生細胞があればその付着を可能にするように2時間平板培養させる。次に細胞を収集し、さらに72時間膨張させる。その後、細胞を収集し、1本のバイアルにつき $1 \times 10^7$ 個の細胞のアリコート内で凍結保護物質を用いて液体窒素中で凍結させる。偶発性作用物質が存在しないか形質転換されたCD34<sup>+</sup>細胞をひとたびテストしたならば凍結した形質転換済みCD34<sup>+</sup>細胞を解凍し、 $1 \times 10^5$ 細胞/mlの濃度まで平板培養し、骨髓刺激培地内でさらに48時間培養することができる。形質転換した細胞を次に収集し、2回洗浄し、通常生理食塩溶液の中で再懸濁させる。輸液によって患者に注入し戻すのに用いられるトランスダクションを受けた細胞の数は、注入部位1つにつき患者一人あたり最低 $1 \sim 10 \times 10^7$ 個の細胞の割合で計画され、最高4つの注入部位を必要とする。輸液は、患者の骨髓の中に直接戻すか又は末梢血流内に直接戻すように行なうことができる。自己由来のトランスダクションを受けた骨髄細胞を受けた患者は、既存の骨髄集団を涵濁させるよう、部分的にか又は全身的に照射を受けることができる。治療は、GC活性を見極めるための輸液後さまざまな時点で、又分化された細胞タイプ内の発現の長さについて、評価することができる。フォローアップ手順の間の或る時点で発現が低下するか又は存在しない場合、トランスダクションを受けた自己由来細胞は患者の体内に再注入することができる。

#### 例15

組織特異的細胞RNAを用いた不能になったシンドビスベクターの活性化による組織特異的発現

結腸直腸ガンの治療のためのシンドビス腫瘍特異的発現ベクターの構築

A. CER腫瘍標識の発現に依存する組換え型シンドビスベクター(SIN-CEA)の構築



シンドビスパッケージング細胞系統の中で不能にされたシンドビスベクター粒子を産生するため、シンドビスベクターをDNAポリメラーゼプロモーターによって駆動させなければならない。ベクターRNAのインビトロ転写を使用しそれに続いてシンドビス細胞系統内にRNAを貫通させるというオプションは不能になったRNA写しにより生成される三次構造が完全なゲノミック写しを防ぎ、パッケージング細胞系統内のベクター複製及び力価を制限する可能性があることから、勧められない。この理由から、CMV MIEPプロモーター (pCMV-SIN) 又はDrosophilaメトロチオネインプロモーター (pMET-CMV) を含む出発シンドビスベクターが、パッケージング細胞系統 (すなわち昆虫又は哺乳動物) に応じて使用される。

前述の通り、不能にされた接合ループアウトモデルは、選択されたRNAに相同である逆方向反復塩基配列によってベクターの接合領

域がフランキングされている状態で、構築される。この例では、CEA腫瘍抗原cDNA (Beauchemin et al., Molec. and Cell. Biol. 7:3221, 1987) からの配列が、逆方向反復の中で使用される。CEA RNA応答性シンドビスベクターを構築するため、接合領域の前には、6つの塩基対ヒンジドメインによって分離された2つのCEAアンチセンス配列ドメイン (A' 及びB') がくる。A1に対し相補的である単一の20の塩基対CEAセンス配列 (A2) が、接合領域の3' 末端に置かれる。正しいA1及びB1アンチセンス配列を選択するにあたり、唯一2つの必要条件は、それらが標的RNA配列に対して特異的であることそしてアンチセンス配列が3つのヌクレオチドにより分離された2つのRNA配列ドメインに対してハイブリッド形成すること、である。この3つのヌクレオチドギャップは、ベクターの非構造タンパク質ドメインをベクターの接合領域に架橋する読取り鎖をホップ及びスウィッチするべくポリメラーゼのためのヒンジドメインとして役立つことになる (図5)。このような形態を構築するためには、極端の5' 及び3' 末端に適当な制限酵素部位を含むフラグメントインサートを作り出すため、互いに相補する2つのオリゴヌクレオチドが合成される。このオリゴヌクレオチドフラグメントインサートは、このときシンドビスベクターの多重クローニング部位と不能になった接合領域の間でシンドビスベクター内に連結される。

5' から 3' までのセンスオリゴヌクレオチド鎖は、Apa I 制限部位とそれに続くA1アンチセンスドメイン、6 bpのヒンジドメイン、B1アンチセンスドメイン、合成接合領域ドメイン及びA2アンチセンスドメインとそれに続くXho I 制限酵素部位を含む。CEA RNA応答性シンドライベクターを設計するためには以下のオリゴヌクレオチド配列が使用される。ヌクレオチド番号配列は、Beauchemin et al., Molec. and Cell Biol. 7: 3221, 1987から得られる。

### 5' - 3' CEAセンス鎖

CEA 618 CEA 589  
 \*-----\*  
 ApaI  
 CGC GC G GGC CCT GT G ACA T TG AAT AGA GT G AGG G TC CTG  
 TTG GG (配列番号71)

CEA 651 CEA 622  
 \*-----\* \* 合成  
 A AAG G TT TCA CAT TT G TAG C TT GCT GTG TC A TTG C GA TCT  
 CTA CG (配列番号72)

CEA 599 CEA 618  
 接合コア \*-----\* XhoI  
 G TGG T CC TAA ATA GT T CAC T CT ATT CAA TG T CAC A CT CGA  
 GCC GG (配列番号73)

5' - 3' CEAアンチセンス鎖は、上述のオリゴヌクレオチドに対して相補的である。両方のオリゴヌクレオチドが合成された後、オリゴヌクレオチドを10mMのMgの存在下で混合し、5分間1000℃まで加熱し、ゆっくりと室温まで冷却する。その後、オリゴヌクレオチド対をApa I 及びXho I 制限酵素で消化させ、同じ酵素で予め消化されたプラスミドpCMV-SIN又はpMET-SINに対するインサートのモル比25:1で、混合し連結した。これらの構成体はそれぞれpCMV/SIN-CEA及びpMET/SIN-CEAと呼ばれる。

ガンマイインターフェロンを発現するSIN CEAベクター及び生産者細胞系統 (SIN-CEA/gIFN) の構築

チオシアン酸グアニジニウム抽出とそれに続くCsCl比重差による超遠心分離によってPHAで刺激されたJurkat T細胞から分離されたRNAから、ヒト $\gamma$ -IFN cDNAを誘導する。次にRNA (Sigma, St. Louis, MO) をインビトロで逆転写させ、Taqポリメラーゼを用いたポリメラーゼ連鎖反応によって $\gamma$ -IFN cDNAを増幅させるため遺伝子特異的オリゴヌクレオチド対を使用する。PCR DNAをT4 DNAポリメラーゼ及びクレノウで修復し、CIAPで

処理されたSK<sup>+</sup>プラスミド (Stratagene, San Diego, CA) のHinc III部位の中にクローニングさせた。センス配向で、cDNAの5'末端は、SK<sup>+</sup>ポリリンカーのXho I部位に隣接しており、3'末端はCla I部位に隣接している。ヒト $\gamma$ -IFN分子をコードする512塩基対フラグメントをpCMV/SIN-CEA又はpMET/SIN-CEAベクターのいずれかのXho I/Cla I部位に入れる。これらの新しいプラスミドをそれぞれ、pCMV/SIN-CEA/ $\gamma$ -IFN又はpMET/SIN-CEA/ $\gamma$ -IFNと呼称する。

#### B. チミジンキナーゼを発現するSIN-CEAベクター及び生産者細胞系統 (SIN-CEA/TA) の構築

pHS1TK3KB (Mcknight et al., Nuc. Acids. Res. 8: 5949, 1980) クローンを標的DNAとして使用して、5' Xho I 及び 3' Cla I 制限酵素部位でフランキングされた単純ヘルペスチミジンキナーゼ (「HSVTK」) のcDNAクローンを含むPCR増幅された産物を得る。PCR増幅のために使用されたプライマーについての配列は、公表された配列 (Wagner et al., PNAS, 78: 1442, 1981) から得られる。このとき、1260塩基対の増幅産物は、Xho I 及び Cla I で消化され、pCMV/SIN-CEA又はpMET/SIN-CEAベクターのいずれかのXho I/Cla I 部位に連結される。これらの新しいプラスミドは、それぞれpCMV/SIN-CEA/HSVTK又はpMET/SIN-CEA/HSVTKと呼称される。

#### C. CEA RNA依存性シンドビスベクター生産者細胞系統の作製

生産者細胞系統を作り上げる前出の例 (例7) とは異なり、ベクタートランスフェクションにより、パッケージング細胞系統内への唯一回の遺伝子トランスファが可能である。これらのベクターは不

能にされ完全ゲノミックベクターの合成において防止されていることから、シンドビスパッケージング細胞系統の新鮮な層の再感染は、これらのベクターが活性状態になるのにCEA RNAの存在に依存しているために、頓座感染に終わることになる。例11で前述したRT-PCR技術を用いて、トランスフェクションを受けた生産者細胞系統を希釈クローニングすることによって、より高い力価を達成することが可能である。

#### 例16 シンドビスベクターを用いた置換遺伝子療法

### 合成タンパク質産生のための組換え型シンドビスベクターを用いた置換遺伝子療法

#### 第VIII因子欠損型血友病Aの治療法

血友病は、血漿凝固因子である第VIII因子が欠如していることを特徴とする。およそ2万人に1人の男性が、血液凝固カスケードを完成させる能力がないことによる出血障害として疾病状態が現われる血友病Aを有している。

血友病A患者の治療は、第VIII因子タンパク質での置換である。ヒト第VIII因子の唯一の供給源はヒト血漿である。第VIII因子の精製のためヒト血漿を処理するためには、人間のドナー試料が1000人以上のドナーのロットでプールされる。第VIII因子タンパク質が不安定なものであるため、結果として得られる薬学的産物は非常に不純であり、重量純度の見積りは約0.04%である。さらに、なかでもB型肝炎ウイルス及びヒト免疫不全症ウイルスといったような、血液供給源を汚染し従って第VIII因子タンパク質と潜在的に同時精製可能であるような感染性疾患の重大な兆しが現われている。

上述の理由で、第VIII因子の組換え型産生源が血友病Aの治療に向けての将来性ある進歩を画すると思われる。

血友病Aの理想的な治療は、遺伝子置換療法すなわち、正常な凝固カスケードが結果として起こりうるようにする正常な第VIII因子を患者の体内で置換する方法がある。

上述のことは、血友病A障害の考えられる治療について当業者にとって周知の事柄である。第VIII因子の発現のために開発されてきた考えられる1つの遺伝子治

療ベクターはレトロウイルスである。しかしながら、理由はわからないがこの方法及びその他の方法での組換え型第VIII因子の発現レベルは比較的低いものである。

レトロウイルス及びその他のベクターによるトランスダクションを受けた細胞内での組換え型第VIII因子の低い発現について考えられる1つの可能性は、核小体から細胞質への成熟第VIII因子RNAの処理及び輸送の比較的低い効率である。当業者にとっては既知の通り、第VIII因子のBドメインの欠失はこの凝固因子が産生され分泌されるレベルを増大する。

低いRNA発現レベル及び不十分な処理に起因する第VIII因子タンパク質の低いレベルに付随する問題を回避するため、シンドビスベクター内への第VIII因子cDNAの挿入が記述されている。シンドビスの生活環は感染細胞の細胞質の中で完全に起こることから、核小体から発現された第VIII因子に付随する問題は避けられる。その上、シンドビスの自己複製する効率から見て、理論的には、シンドビス／第VIII因子感染細胞内での第VIII因子産生レベルは、細胞1個あたり  $1 \times 10^8$  の第VIII因子タンパク質分子といった高いものとなりうる。

シンドビスベクター内に第VIII因子を挿入することに付随する潜在的な1つの問題点は結果として得られるベクター／非相同遺伝子構成体の物理的サイズ及び、第VIII因子ベクター構成体を機能的な感染性シンドビス粒子内にパッケージングするという考えられる制約条件である。野生型シンドビスのゲノミックサイズは、11,703ヌクレオチドと1つのポリAテイルである。シンドビス塩基性ベクター構

成体 (pKSSINBV、例2参照) のサイズは、25-merポリAテイルを含めて7830ヌクレオチドである。かくして、野生型ウイルスと同じ物理的サイズのゲノミック補体という結果をもたらすpKSSINBV内に挿入すべき非相同遺伝子材料の許容サイズは、3898ヌクレオチドである。

しかしながら、1つの主要な証拠書類によると、pKSSINBV内に挿入され機能的感染性シンドビス粒子内にパッケージングされ得る非相同性遺伝子材料の容量が3898bpsよりもはるかに大きいということが示唆されている。文献(Geigenmuller

-Gnirke et. al., PNAS 88: 3253-3257, 1991)内で公表された研究作業においては、各々シスー要求パッケージングシグナルを含む2つの分子の、単機能シンドビス粒子へのパッケージングについて記述されている。この研究における2つのパッケージングされたゲノムの合計物理サイズは14600bpsである。この結果は、非相同遺伝子材料のためのシンドビスベクターの容量が以前に想像されたものよりもはるかに大きいということを、強力に示している。シンドビスベクター内への大きい細胞遺伝子の挿入の潜在的可能性は、この系の有用性を実質的に拡大する。

第VIII因子cDNAクローンは野生型8000bpsである。pKSSINBV内への第VIII因子cDNAの挿入は野生型15830bpsのベクター／非相同ゲノミックサイズを生み出す。この粒子のパッケージングが低効率であるならば、第VIII因子インサートの「B-ドメイン」を削除することによりインサートのサイズをさらに減少させることができる。ひきつづき発現されるタンパク質の官能性に影響を及ぼすことなく、cDNAから第VIII因子B-ドメイン領域を除去することが可能であるということが示されてきた。

第VIII因子cDNAの供給源はクローンpSP64-VIII、つまり全長ヒトタンパク質をコードするcDNAを有する受け入れ番号39812のATCCクローンである。pSP64-VIIIはSal Iで消化され、末端はT4 DNAポリメラーゼと各dNTPを50  $\mu$ M用いて平滑末端化され、ca. 7700bpのフラグメントは、1%のアガロース／TBEゲル上で電気泳動され、Gene Clean™で精製される。平滑末端を含む第VIII因子のcDNAを次に、Hinc IIでの消化により前処理され、CIAPで処理され、Gene Clean™で精製されたpKS II 3' SIN(例2)の中へ連結させる。このプラスミドはpF83' SINとして知られている。

例2に記述されているさまざまなシンドビスベクター内への第VIII因子の挿入のため、プラスミドpF83' SINをXho I及びSac IIで消化し、結果として得られた7850bpのフラグメントを1%のアガロース／TBEゲル上で分離し、Gene Clean™により精製する。この第VIII因子-3' SINフラグメントを以下に列挙するベクターの各々の中に挿入する。このフラグメントの挿入に先立って、Xho I及びSac II

での消化によりプラスミドを前処理し、CIAPで処理し、1%のアガロース/TBE  
ゲル電気泳動により分離し、Gene Clean™で精製する：

<u>ベクター</u>	<u>機能的接合領域 (+/-)</u>
pKSSINBV	+
pKSSINd1JRsjrc	+
pKSSINd1JRsjrPC	+
pKSSINd1JRsjrNP (7, 582-7, 601)	+
pKSSINd1JRsexjr	+

第VIII因子cDNAの挿入の後、これらのベクターはそれぞれ、以下の通り呼称さ  
れる：

pKSSINBVF8	
pKSSINd1JRsjrcF8	
pKSSINd1JRsjrPCF8	
pKSSINd1JRsjrNP (7, 582-7, 601)F8	
pKSSINd1JRsexjrF8	

第VIII因子cDNAを含むベクターのパッケージングは、ベクター/第VIII因子で  
インビトロ転写されたRNAでトランスフェクションされた細胞を野生型ウイルス  
で感染させることによって、又は代替的には、例7に記述されたパッケージング  
細胞系統のインビトロ転写されたベクター/第VIII因子RNAでのトランスフェク  
ションによって達成される。パッケージング効率は、感染細胞内の第VIII因子発  
現を測定し、例3に記述されているpKSSIN<sup>+</sup>-lucベクターを用いて行なわれた同じ  
実験において観察される発現レベルと比較することによって、決定される。

#### 例17 グルコセレブロシダーゼシンドビスベクターの作製

まず最初に、cDNAコーディング配列の5'にXho I 制限酵素部位を及びcDNAコ  
ーディング配列の3'にCla I 制限酵素部位を含むグルコセレブロシダーゼ (GC  
) cDNAクローンを生成する。このクローンは、Nco I でpMFG-GC (PNAS 89:1132  
:1992) を消化することによって生成され、Vent DNAポリメラーゼで平滑末端化

され、Xho I リンカーを連結されうる。プラスミドを次にBamH I で消化させ、Vent DNAポリメラーゼで平滑末端化し、次にCla I リンカーに連結させる。第VIII因子を例2で記述されたさまざまなシンドビスベクター内に挿入するため、次にフラグメントをXho I 及びCla I で消化させ、1 %のアガロース/TBEゲル上でゲル分離させ、Gene Cleanで精製する。GCフラグメントを、Xho I 及びCla I での消化、CIAPでの処理、1 %アガロース/TBEゲル電気泳動による分離及びGene Cleanでの精製によって前処理された以下のベクターの各々の中に挿入する。

ベクター	機能的接合域 (+/-)
pKSSINBV	+
pKSSINd1JRsjrc	+
pKSSINd1JRsjrPC	+
pKSSINd1JRsjrNP (7582-7601)	+
pKSSINd1JRsexjr	+

第VIII因子cDNAの挿入の後、これらのベクターは以下に示すものとして知られている。

pKSSINBV-GC	
pKSSINd1JRsjrc-GC	
pKSSINd1JRsjrPC-GC	
pKSSINd1JRsjrNP (7582-7601)-GC	
pKSSINd1JRsexjr-GC	

グルコセレブロシダーゼ (GC) シンドビスベクターは、動物研究においてGC cDNAを発現するために用いられ、場合によっては直接注入により人間を治療するために用いられることになる。治療を受けた患者の体内でのGC発現を持続させるために多重注入が必要とされる場合、シンドビスベクターが最低限の抗原性をもつように設計されているか又はベクターに対する免疫応答を誘発しないような形で設計されていれば理想的であろう。このような要領で設計されており多重タンパク質を発現することのできるシンドビスベクターの例は、例3 (アデノウイルス早期領域E3) ; 例4 (HCMV H301) ; 例5 (同義遺伝子の発現) 及び例17 (イ



インターフェロンAのリボザイム発現)の中で記述されている。上述の例を用いると、ベクターの多重クローニング部位において同じXho I ~ Cla Iクローニング部位を用いて、インターフェロンAヘアピンリボザイムの後にADE3又はCMVH301遺伝子が続きその後に内部リボザイム進入部位が続き、

その後GC cDNA又はその他の治療的緩和剤が続くような形態でGC cDNAを発現するようにシンドビスベクターを設計することが可能である。

#### B. シンドビスグルコセレブロシダーゼベクター産生細胞系の構築

例7に記述されている、使用されるシンドビスcDNAベクタークローンのタイプに応じて生産者細胞系統を作製する2つのアプローチが紹介される。1つのシンドビスベクタータイプは、インビトロRNA写しの合成のために、SP6 RNAポリメラーゼ認識配列を使用する。このタイプのベクターは、パッケージング細胞系統内で持続的に複製することになる組込みしないベクターに基づいてベクター生産者細胞系統を作り出すために用いられる。第2のタイプのベクターは、パッケージング細胞系統内での安定した組込みを可能にするプラスミド構成体の中でSP6配列の代わりに非相同プロモーターを使用する(再考のため例7参照)。このとき複製応答能あるシンドビスベクターの写しがDNAレベルから発現され、シンドビスパッケージング細胞系統内にトランスフェクションされることになる。

シンドビスGCウイルスベクターがT7 RNA認識配列を使用する場合、cDNAはまず市販のインビトロ転写系(Megascript転写キット: Ambion Inc., Austin, Texas)のいずれかを用いてインビトロ転写され、その後リボソーム又はリン酸カルシウム沈降によりシンドビスパッケージング細胞系統内に全長RNA写しがトランスフェクションされる。前述の通り(例7)、トランスフェクションを受けたパッケージング細胞系統からの感染性ベクター粒子を含むろ過された上清は、次にシンドビスパッケージング細胞の新鮮な単層を再度感染させるのに使用され、この単層はこのときウイルスベクターの供給源として役立つ。10cmの皿の中で $5 \times 10^6$ 個の細胞を感染させるためには、約10mlの感染性上清を使用しなければならない。

シンドビスGCウイルスベクターが、選択可能な標識（ネオマイシン耐性遺伝子）を伴う発現プラスミド形態の中で非相同プロモーターを使用する場合、cDNAベクターはパッケージング細胞系統の中にトランスフェクションされ、その後薬物耐性選択の行なわれなければならない。次に耐性コロニーをプールし希釈クロニングする。その後、個々のクローンを増殖し、凍結させる。次に個々のクローンを、ウェスタンブロット分析法によりグルコセレブロシダーゼの発現について（及び）例9に記されているような高い力価についてスクリーニングし、タンパク質の機能的活性についてテストする（Correll et al., Blood 80: 331, 1992）。

選択可能な標識をもたないベクターについては、安定した形で又は持続的にトランスフェクションされたクローンの選択は、細胞をシンドビスベクターでトランスフェクションしてから1日～2日後にパッケージング細胞系統を希釈クロニングすることによって行なわれなくてはならない。その後、伝令RNAの逆転写とその後に続くポリメラーゼ連鎖反応技術によるcDNAメッセージの増幅を用いて、グルコセレブロシダーゼの存在について希釈クローンをスクリーニングする。この手順は、RT-PCR技術として知られており、Invitrogen Corp. (San Diego, CA)を通してこの検定を実施するための市販キットを入手することができる。RT-PCRは、少なくとも10日間増殖させられたクローンについて行なわれる。安定した持続的に感染を受けたクローンの適正な数を見出すため、約50～100のクローンをスクリーニングする。RT-PCRを行なうためには、RNA産物の増幅によって望ましいメッセージがスクリーニングされるよう、特異的プライマーが必要とされる。グルコセレブロシダーゼスクリーニングのために521塩基対産物を増幅するように設計されたプライマーは、以下のものである。

#### グルコセレブロシダーゼのスクリーニングのためのプライマー

GC PCR(F) プライマー #1: 5'

TTT CTG GCT CCA GCC AAA GCC ACC CTA GGG GAG 3'

(配列番号74)

GC PCR(R) プライマー #2: 5'

AAT GGA GTA GCC AGG TGA GAT TGT CTC CAG GAA 3' (配列番号75)

このとき、最高の発現及び力価を示すクローンが、BHK-2細胞を感染させることによる発現のトランスファについてテストされ、それに続いてウェスタンブロット分析及び、BHK-2細胞内のグルコセレブロシダーゼ (GC) 活性についての機能的検定が行なわれる。ウェスタンブロット (PNAS 89:11332, 1992) のためにはヒトGCに対する特異的モノクローナル抗体 (8E4) が用いられ、これは Barneveld, R. A. et al. (Eur. J. Biochem. 134:310, 1983) 中で記述されている。適切なクローンがひとたび同定されたならば、ベクターを得るため成長培養からの上清が用いられ、0.45uc フィルターを通してろ過され、動物の体内への直接注入を介して動物研究を始めるのに用いられる。動物研究がひとたび行なわれたならば、動物研究から誘導されたスケールアップした直接注入プロトコルをゴージェ病患者の治療のために使用することができる。このベクターのための代替的投与プロトコルは、以下の例で示されている。

#### 例18

シンドビスウイルスのベクターから発現された配列特異的アンチセンスまたはリボザイム分子によるヒト乳頭腫ウイルスの病原性の阻止

今日まで、上皮由来の細胞について顕著な向性を有する、ヒト乳頭腫ウイルス (HPV) の60より大きい型が単離されそして特性決定さ

れた。HPV群の中には、ヒトの肛門性器の道を感染する実質的な数の型が存在する。この群のHPVは、肛門性器の道の良性または悪性の増殖に関連する型にさらに再分割することができる。

米国において1年につき13,000~20,000の子宮頸癌の死亡が存在する。開発途上国において、子宮頸癌は最も頻繁な悪性疾患であり、そして先進国において子宮頸癌は乳癌、肺癌、子宮癌、および卵巣癌の後に等級づけられる。肛門性器の増殖が増大しつつある健康の問題であるという見解を殊に支持する1つの統計学は、性器いぼについての医学的相談が1966年における169,000件から1988年における2百万件より大に増加したことである。

HPVを頸部の増殖の疾患の病原性に関連させるいくつかの証拠が存在する。型

の明確なサブセット、いわゆる「低い危険のHPV」は頸の良性の増殖状態に関連する（例えば、HPV6, 11, 43, 44）が、型の他のサブセット、「高い危険のHPV」は悪性の状態に進行することがある病変に関連する（例えば、HPV16, 18, 31, 33, 35など）。子宮頸腫瘍のほぼ95%はHPVを含有し、HPV16または18型のDNAはそれらの約70%において見出される。

若い性的に活性な女性の集団におけるHPVの頻度は非常に高いように思われる。事実、454人の大学の女性の最近の研究において、213人、すなわち、46%はHPV陽性である。HPV陽性の群の間で、3%はHPV6/11陽性であり、そして14%はHPV16/18陽性であった。これらの454人の女性のうちで、33人(7.3%)は、細胞学により決定して、異常な子宮頸の増殖を有した。

HPVにターゲッティングされるアンチセンスおよびリボザイムの治療因子の設計に關すると、ターゲッティングすべきHPV型（すなわち、尖圭コンジロームに関連する型または悪性の子宮頸の増殖に関連する型）およびターゲッティングすべきHPV発現遺伝子（これ

らはHPV遺伝子E2, E6, またはE7を包含するが、これらに限定されない）に関して考慮すべき重要なパラメーターが存在する。

一般に、HPV遺伝子の発現は一時的に2つの期で定められる、すなわち、ウイルスDNAの複製前に発現される初期の（E）遺伝子、すなわちウイルスDNAの複製後に発現される後期の（L）遺伝子。7つの初期の酵素HPV遺伝子、および2つの後期の構造HPV遺伝子が存在する。

上に掲示した議論に基づいて、ウイルスE2遺伝子をターゲッティングするHPV6/11群に対して向けられたアンチセンス/リボザイム治療因子を構成することができる。E2タンパク質の発現の阻害によりウイルスの組込みを維持する機構により、E2遺伝子の標的はHPV16/18群に関して不確かであることがある可能性があるように思われる。こうして、HPV16/18型におけるE6/E7遺伝子は直接ターゲッティングすべきであるように思われる。

HPV16型E6およびE7のRNAに対して特異的なシンドビスウイルスのベクター（実施例2に記載する）の中へのアンチセンスおよびリボザイムの治療因子の構成を

下に記載する。HPVのアンチセンスおよびリボザイムの部分の挿入はシンドビスベクターのCla I およびXho I 部位の間である。

#### A. HPV16E6/E7アンチセンス治療因子の構成

HPV16ウイルスのゲノムのクローン、pHPV-16(ATCC No. 45113)を、ウイルスE6/E7遺伝子からの特定の配列の増幅のためのPCR反応において鋳型として使用する。HPV16アンチセンス部分をまずプラスミドベクターpKS<sup>+</sup> II'の中に挿入する；プラスミドベクターからのアンチセンス治療因子の除去および種々のシンドビスベクターの主鎖の中への挿入は、独特アンチセンス部分の末端のCla I およびXho I 制限エンドヌクレアーゼ部位を経て達成される。HPV16E6/

E7遺伝子的一部分の増幅は下に示すプライマーの対を使用して達成される：

前方のプライマー（緩衝配列/Xho I 部位/HPV16ヌクレオチド201-222）：

TATATTCTAGAGCAAGCAACAGTTACTGCCGACG（配列番号76）

逆プライマー（緩衝配列/Cla I 部位/HPV16ヌクレオチド759-738）：

TATATATCGATCCGAAGCGTAGAGTCACACTTG（配列番号77）

HPV16E6/E7相補的配列に加えて、両方のプライマーはPCRアンプリコン生成物の効率よい酵素消化のためにそれらの5'末端に5ヌクレオチドの「緩衝配列」を含有する。上に示すプライマーを使用するHPV16アンプリコンの発生は、実施例4に記載するPCRプロトコールを使用して達成される。感染した子宮頸上皮中のE6/E7mRNAは3つの形態、すなわち、アンスプライスのオールタネイティブおよび2つのスプライスされたオールタネイティブ（E6\*およびE6\*\*）、E6のヌクレオチド226-525が成熟メッセージの中に存在しないもの、で存在することが従来示された(Smotkinら、J. Virol. 63: 1441-1447, 1989)。ここに記載するアンチセンス部分とHPV16ゲノムとの間の相補性の領域はウイルスのヌクレオチド201-759である。こうして、アンチセンス部分はE6/E7アンスプライスメッセージおよびスプライスE6\*E6\*\*スプライスメッセージに結合しそしてそれらの翻訳を阻害することができるであろう。

HPV16E6/E7の580bpのアンプリコン生成物をまずジーン・クリーン（Gene Clean）（Bio 101、カリフォルニア州サンディエゴ）で精製し、制限酵素Cla I およ

びXho I で消化し、そして1 %アガロース/TBEゲル上で電気泳動させる。次いで568bpのバンドをゲルから切り出し、DNAをジーン・クリーンで精製し、そしてpKS II<sup>+</sup>

プラスミドの中に結合し、そしてpKS II<sup>+</sup>はCla I およびXho I を使用する消化、CIAPを使用する処理、およびジーン・クリーンを使用する処理により調製される。このプラスミドはpKSaHPV16E6/E7として知られている。

#### B. HPV16E6/E7ヘアピンリボザイム治療因子の構成

HPV16のE6およびE7タンパク質の発現を効率よく阻害するために、E6mRNAに対する標的の特異性をもつヘアピンリボザイム (HRBZ) を構成する。HPV16リボザイム部分をまずプラスミドベクターpKS II<sup>+</sup>の中に挿入する；プラスミドベクターからのリボザイム治療因子の除去および種々のシンドビスベクターの主鎖の中への挿入は、独特リボザイム部分の末端のCla I およびXho I 制限エンドヌクレアーゼ部位を経て達成される。

HRBZは下に示すHPV16E6RNA(ヌクレオチド414-431)に対して相同性である：

TTAACTGTCAAAAGCCAC (配列番号78)

HRBZはTCTCヘアピン中のT残基の後で、上に下線で示す、リボザイムのループ5'基質のモチーフを切断するように設計する。切断後、HRBZを再循環させ、そしてHRBZは他のアンスプライスE6/E7mRNAまたはE6\*スプライスマRNA分子にハイブリダイゼーションし、そしてそれを切断することができる。

従来定められた二本鎖HRBZ (Hampelら、Nucleic Acids Research 18:299-304, 1990)は、4塩基の「テトラループ」3および延長したらせん4を含有し、上に示したHPV16E6のRNAに対する特異性を持ち、化学的に合成されそして、それぞれ、Cla I およびXho I 部位の両方の5' および3' 末端を含む。化学的に合成されたHPV16E6HRBZ鎖の配列を下に示す：

HPV16E6HRBZ、上部の鎖 (5' → 3' ) :

CGATGTGGCTTTTAGATGTAAACCAGAGAAACACACGGACTTCGGT

CCGTGGTATATTAGCTGGTAT

(配列番号79)

HPV16E6HRBZ、下部の鎖 (5' - 3') :

CTAGATACCAGCTAATATACCACGGACCGAAGTCCGTGTGTTTCTCTGG

TTTAACATCTAAAAGCCACAT (配列番号80)

Cla I および Xho I の粘着末端をもつ二本鎖 HPV16E6 特異的 HRBZ を形成するために、等しい量のオリゴヌクレオチドを 10mM の  $Mg^{2+}$  中で一緒に混合し、95℃に 5 分間加熱し、次いで室温にゆっくり冷却して鎖をアニーリングさせる。

Cla I および Xho I 粘着末端をもつ二本鎖 HPV16E6HRBZ をまず pKS II' プラスミドベクターの中に結合し、pKS II' は Cla I および Xho I を使用する消化、CIAP を使用する処理、および ジーン・クリーン を使用する処理により調製させる。このプラスミドは pKSHPV16E6HRBZ として知られている。

HPV16 アンチセンス および ヘアピン リボザイム 部分をそれらのプラスミドベクター、それぞれ、pKSaHPV16E6/E7 および pKSHPV16E6HRBZ から遊離させる。ここで Cla I および Xho I で消化し、アガロースの電気泳動 および ジーン・クリーン で精製し、そして、Cla I および Xho I を使用する消化 および CIAP を使用する処理により調製された、所望のベクターの主鎖の中に挿入する。いくつかの可能なシンドビスベクターは、HPV16 アンチセンス および リボザイムの治療因子の部分の挿入のために適当であり、それらのベクターのいくつかは下に示されており、そしてその詳細な構成は実施例 2 に記載されている。

ベクター	機能的接合領域 (+/-)
pKSSINBV	+
pKSSINBVd1JR	-
pKSSINd1JRsjrc	+
pKSSINd1JRsjrPC	+
pKSSINd1JRsjrNP (7582-7601)	+
pKSSINd1JRsexjr	+

アンチセンス および リボザイムの治療因子は RNA のレベルで働くので、これらの部分を含有するベクターが機能的接合領域を含有することは不必要である。す

なわち、シンドビス構造タンパク質に相当する領域の翻訳はサブゲノムRNAからのみ起こる。しかしながら、アンチセンスおよびヘアピンリボザイムの治療因子の翻訳は結果ではないので、これらの部分はプラス鎖シンドビスゲノムのベクターRNAのレベルからそれらの影響を発揮する。

他方において、反復した投与量を個体に投与ことは望ましいことがある；こうして、アンチセンスおよびヘアピンの緩和因子 (palliative) はアデノウイルスE3またはヒトサイトメガロウイルスのH301遺伝子の下流に挿入され、ここでE3またはH301遺伝子は感染した細胞におけるMHCクラス I 分子の発現をダウンレギュレーションする。アンチセンスおよびヘアピンの緩和因子の挿入は、下に示す実施例3および4からのベクターにおいて、Cla I およびXho I 部位の間で達成される：

ベクター	機能的接合領域 (+/-)
pKSSIND1JRsjrcAdE3	+
pKSSIND1JRsjrcH301	+

サブゲノムmRNAはこれらのベクターの中で合成され、Ad E3およびCMV H301遺伝子のための翻訳鋳型として働く。こうして、これら

の構成体において、機能的HPV16アンチセンスおよびヘアピンリボザイムの緩和因子はサブゲノムおよびプラス鎖ゲノムの両方のシンドビスベクターRNAのレベルで存在するであろう。

さらに、HPV16アンチセンスおよびヘアピンリボザイムの緩和因子は、記載したシンドビスベクターの中に挿入された異種遺伝子の下流に挿入される。例えば、HPV16アンチセンスおよびヘアピンリボザイムの緩和因子は、例えば、E6/E7またはL1タンパク質からの、HPV16の免疫原性エピトープをコードする異種遺伝子の下流に挿入できるであろう。これらのベクターにおいて、免疫調節Ad E3またはCMV H301遺伝子を含有させることは望ましくないであろう。

高いおよび低い危険の両方のHPV群による感染の間のE6/E7遺伝子の発現は、子宮頸上皮の増殖のために要求される。試験したHPV型からのHPVE7タンパク質は網膜芽細胞腫タンパク質と複合体を形成し、そしてHPV16および18型からのE6タ



ンパク質は細胞p53タンパク質に連合しそしてそれを分解する。p53および網膜芽細胞腫細胞の遺伝子生産物は細胞の成長調節に関係づけられ、そしてこれらのタンパク質の発現または機能の変更は影響を受けた細胞における成長の調節を解放することができる。こうして、両方のHPV群に対するアンチセンスまたはリボザイムの治療因子はこれらの遺伝子の一方または両方の発現を直接または究極的に減少するであろう。E6/E7遺伝子の発現はウイルスE2タンパク質によりトランス活性化される。しかしながら、別のスプライシング戦略を利用することによって、E2タンパク質はまたトランススクリプターとして使用することができる。オンコジーンHPV型の組込みはウイルスE2領域において起こり、そしてE2タンパク質の発現を阻害する。オンコジーンHPV型による組込みは、子宮頸癌の明白な誘発および／または維持において重要な事象であるように思われた。この事象はE6/E7遺伝

子の連続的発現を生ずる。組込まれた状態にいて、E6/E7遺伝子の発現は感染したケラチノサイトの中に存在する因子によりトランス活性化される。E6/E7発現の細胞ケラチノサイト因子の活性化に応答するウイルスE2の調節機構の不活性化は、ウイルスの組込みにおいて決定的な事象である。

HPV16型E6およびE7RNAに対して特異的なシンドビスウイルスのベクター（実施例2に記載する）の中へのアンチセンスおよびリボザイムの治療因子の構成を下に記載する。HPVアンチセンスおよびリボザイム部分の挿入は、シンドビスベクターのCla I およびXho I 部位の間である。

### C. HPV16E6/E7アンチセンス治療因子の構成

HPV16ウイルスゲノムのクローン、pHPV-16 (ATCC No. 45113) を、ウイルスE6/E7遺伝子からの特定の配列の増幅のためのPCR反応において鋳型として使用する。HPV16をまずプラスミドベクターpKS II<sup>+</sup>の中に挿入する；プラスミドベクターからのアンチセンス治療因子の除去および種々のシンドビスベクターの主鎖の中への挿入は、独特アンチセンス部分の末端のCla I およびXho I 制限エンドヌクレアーゼ部位を経て達成される。HPV16E6/E7遺伝子の一部分の増幅は下のプライマー対を使用して達成される：

HPV16前方プライマー（緩衝配列/Xho I 部位/HPV16ヌクレオチド201-222）：

5'-TAT ATT CTA GAG CAA GCA ACA GTT ACT GCG ACG-3'

（配列番号81）

HPV16逆プライマー（緩衝配列/Cla I 部位/HPV16ヌクレオチド759-738）：

5'-TAT ATA TCG ATC CGA AGC GTA GAG TCA CAC TTG-3'

（配列番号82）

HPV16E6/E7相補的配列に加えて、両方のプライマーはPCRアンプリコン生成物の効率よい酵素消化のためにそれらの5'末端に5ヌクレオチドの「緩衝配列」を含有する。上のプライマーを使用するHPV16アンプリコンの発生は、実施例4に記載するPCRプロトコールを使用して達成される。感染じた子宮頸上皮中のE6/E7mRNAは3つの形態、すなわち、アンスプラ・イスのオールタネイティブ（E6\*およびE6\*\*）、ここでE6のヌクレオチド226-525は成熟メッセージの中に存在しない、で存在することは知られている（Smolkinら、J. Virol 63:1441-1447, 1989）。アンチセンスとHPV16ゲノムとの間の相補性の領域はウイルスのヌクレオチド201-759である。こうして、アンチセンス部分はE6/E7アンスプライスメッセージおよびスプライスE6\*およびE6\*\*メッセージに結合しそしてそれらの翻訳を阻害することができるであろう。

HPV16E6/E7の580bpのアンプリコン生成物をまずジーン・クリーン（Gene Clean）（BIO 101、カリフォルニア州サンディエゴ）で精製し、制限酵素Cla I およびXho I で消化し、そして1%アガロース/TBEゲルにより単離する。次いで568bpのバンドをゲルから切り出し、DNAをジーン・クリーン（Gene Clean<sup>®</sup>）で精製し、そしてCla I およびXho I を使用する消化により調製されたpKS II<sup>+</sup>プラスミドの中に結合し、CIAPで処理し、そしてジーン・クリーン（Gene Clean<sup>®</sup>）で処理する。このプラスミドをpKS α HPV16E/E7と表示する。

#### D. HPV16E6/E7ヘアピンリボザイム治療因子の構成

HPV16のE6およびE7タンパク質の発現を効率よく阻害するために、E6mRNAに対する標的の特異性をもつヘアピンリボザイム（HRBZ）を構成する。HPV16リボザイム部分をまずプラスミドベクターpKS II<sup>+</sup>の中に挿入する；プラスミドベクタ

ーからのリボザイム治療因

子の除去および種々のシンドビスベクターの主鎖の中への挿入は、独特リボザイム部分の末端のCla I およびXho I 制限エンドヌクレアーゼ部位を経て達成される。

HRBZは下に示すHPV16E6RNAヌクレオチド414-431に対して相同性である：

5'-TTA ACT GTC AAA AGC CAC-3' (配列番号83)

HRBZはTGTCヘアピン中の最初のT残基の後で、上に下線で示す、リボザイムのループ5 基質のモチーフを切断するように設計する。切断後、HRBZを再循環させ、そしてHRBZは他のアンスプライスE6/E7mRNAまたはE6\*スプライスマRNA分子にハイブリダイゼーションし、そしてそれを切断することができる。

二本鎖HRBZ (Hampelら、Nucleic Acids Research 18: 299-304, 1990) は、4塩基の「テトラループ」3および延長したらせん4を含有し、上に示したHPV16E6のRNAに対する特異性をもち、化学的に合成されそして、それぞれ、Cla I およびXho I 部位を、それぞれ、5' および3' 末端に含む。化学的に合成されたHPV16E6HRBZ鎖の配列を下に示す：

HPV16E6HRBZ、センス鎖：

5'-

CGA TGT GGC TTT TAG ATG TTA AAC CAG AGA AAC ACA CGG ACT

TCG GTC CGT GGT ATA TTA GCT GGT AT-3'

(配列番号84)

HPV16E6HRBZ、アンチセンス鎖：

5'-

CTA GAT ACC AGC TAA TAT ACC ACG GAC CGA AGT CCG TGT GTT

TCT CTG GTT TAA CAT CTA AAA GCC ACA T-3'

(配列番号85)

Cla I およびXho I の粘着末端をもつ二本鎖HPV16E6特異的HRBZを形成するために、等しい量のオリゴヌクレオチドを10mMのMg<sup>2+</sup> 中で混合し、95℃に5分間加熱

し、次いで室温にゆっくり冷却して鎖をアニーリングさせる。

Cla I およびXho I 粘着末端をもつ二本鎖HPV16E6HRBZをpKS II<sup>+</sup> プラスミドベクターの中に結合する。pKS II<sup>+</sup> ベクターをまずCla I およびXho I で消化し、CIAPで処理し、そして結合前にジーン・クリーン (Gene Clean<sup>®</sup>) で精製する。このプラスミドをpKSHPV16E6HRBZと表示する。

HPV16アンチセンスおよびヘアピンリボザイム部分をそれらのプラスミドベクター、それぞれ、pKSaHPV16E6/E7およびpKSHPV16E6HRBZから遊離させる、ここでCla I およびXho I で消化し、アガロースの電気泳動により単離し、そしてジーン・クリーン (Gene Clean<sup>®</sup>) で精製する。次いで、それらを所望のベクターの主鎖の中に挿入する。ベクターの主鎖はCla I およびXho I を使用する消化により調製し、そしてCIAPで処理する。いくつかの可能なシンドビスベクターは、HPV16アンチセンスおよびリボザイムの治療因子の部分の挿入のために適当である。実施例2からのこれらのベクターのいくつかを下に示す。

ベクター	機能的接合領域 (+/-)
pKSSINBV	+
pKSSINBVdlJR	-
pKSSINdlJRsjrc	+
pKSSINdlJRsjrPC	+
pKSSINdlJRsjrNP(7,582-7,601)	+
pKSSINdlJRsexjr	+

アンチセンスおよびリボザイムの治療因子はRNAのレベルで働く

ので、これらの部分を含有するベクターが、また、機能的接合領域を含有することは不必要である。詳しくは、シンドビス構造タンパク質に相当する領域の翻訳はサブゲノムRNAからのみ起こる。しかしながら、アンチセンスおよびヘアピンリボザイムの治療因子の翻訳は結果ではないので、これらの部分はプラス鎖シンドビスゲノムのベクターRNAのレベルからそれらの影響を発揮する。

他方において、反復した投与量を個体に投与ことは望ましいことがある；こうして、アンチセンスおよびヘアピンの緩和因子はアデノウイルスE3またはヒトサ

イトメガロウイルスのH301遺伝子の下流に挿入される。(E3およびH301遺伝子は感染した細胞におけるMHCクラスI分子の発現をダウンレギュレーションする。

) アンチセンスおよびヘアピンの緩和因子の挿入は、実施例3および4からのベクターにおいて、Cla I およびXho I 制限部位の間で達成される：

ベクター	機能的接合領域 (+/-)
pKSSINd1JRsjrcAdE3	+
pKSSINd1JRsjrcH301	+

サブゲノムmRNAはこれらのベクターの中で合成され、Ad E3およびCMV H301遺伝子のための翻訳鋳型として働く。こうして、これらの構成体において、機能的HPV16アンチセンスおよびヘアピンリボザイムの緩和因子はサブゲノムおよびプラス鎖ゲノムの両方のシンドビスベクターRNAのレベルで存在するであろう。

さらに、HPV16アンチセンスおよびヘアピンリボザイムの緩和因子は、記載したシンドビスベクターの中に含有された異種遺伝子の下流に挿入される。例えば、HPV16アンチセンスおよびヘアピンリボザイムの緩和因子は、HPV16E6/E7またはL1タンパク質の免疫原性エピトープをコードする異種遺伝子の下流に挿入できるであろう。これらのベクターにおいて、免疫調節Ad E3またはCMV H301遺伝子

を含有させることは望ましくないであろう。

#### 例19

シンドビスウイルスのベクターから発現された配列特異的リボザイム分子による感染した細胞におけるヒトインターフェロンAの発現の阻害

インターフェロン (IFNs) は小さいタンパク質のファミリーからなり、これらのタンパク質はMHC抗原の発現、細胞成長の調節を変調するいくつかの遺伝子の発現、およびウイルス感染に対する耐性を包含する、哺乳動物細胞における広い範囲の生物学的活性を実行する (Pestkaら、Ann. Rev. Biochem. 56 : 727-777, 1987)。IFNsの3クラス、すなわち、a、b、およびg、のうちで、IFN-a、すなわち、白血球インターフェロンは感染した細胞におけるウイルスの複製を制限する活性に関係する。

IFN-aの抗ウイルス作用は、感染した細胞におけるウイルスの生活環を阻害す

る2つの細胞酵素に関係する。1つの酵素は二本鎖RNA依存性68kDaのタンパク質キナーゼであり、これはタンパク質合成阻害因子eIF-2のサブユニットのリン酸化を触媒する。IFN- $\alpha$ により誘発される第2酵素は2', 5'-オリゴアデニレートシンターゼ(2', 5'-OAS)であり、これは二本鎖RNAの存在下に潜在的エンドヌクレアーゼ、すなわち、RNアーゼLを活性化し、このRNアーゼLはウイルスおよび細胞のRNAの消化に関係する(JohnstonおよびTorrence, *Interferons* 3:189-298, Friedman(編), Elsevier Science Publishers, B. V., アムステルダム, 1984)。

それらの複製戦略は二本鎖RNAの中間体を含むので、RNAウイルスはとくにインターフェロンの強い誘発因子である。シンドビスウイルスに關すると、二本鎖RNA分子はプラス鎖およびマイナス鎖の両方のゲノム長さの分子の複製の間およびサブゲノムメタノールの

転写の間に存在する。シンドビスウイルスを使用する細胞の感染はインターフェロンの誘発を生ずることが証明された(Saito, *J. Interferon Res.* 9:23-24, 1989)。

治療緩和因子の延長した発現を望む応用において、感染した細胞におけるIFNの発現はシンドビスベクター中のIFN-amRNAに対する特異性をもつヘアピン酵素の含有による阻害される。こうしてIFN- $\alpha$ 発現の阻害は、感染した細胞中でウイルスが複製できる程度を阻害する、eIF-2タンパク質キナーゼおよび2', 5'-OASを包含する、細胞タンパク質のカスケードの誘発を軽減する。ベクター感染細胞に向かってターゲッティングされた免疫応答の誘発なしの治療緩和因子の延長した発現は、抗原の提示以外のすべての応用において望ましくそして、例えば、系統的タンパク質の生産、アンチセンスおよびリボザイム、およびアクセサリー分子を包含する。

#### A. インターフェロンAのmRNAに対するターゲッティングされた特異性をもつヘアピンリボザイムの構成

シンドビスベクターで感染した細胞中のインターフェロンAタンパク質の発現を効率よく阻害するために、インターフェロンAのmRNAに対するターゲッティン

グされた特異性をもつヘアピンリボザイム (HRBZ) を構成する。IFN- $\alpha$ リボザイム部分をまずプラスミドベクターpKS II' (Stratagène、カリフォルニア州ラジヨラ) の中に挿入する；プラスミドベクターからのリボザイム治療因子の除去および種々のシンドライベクターの主鎖の中への挿入は、独特リボザイム部分の末端のCla I およびXho I 制限エンドヌクレアーゼ部位を経て達成される。

HRBZは下に示すヒトインターフェロンアルファ遺伝子IFN-アルファ4bのヌクレオチド1026-1041に対して、そして、5, 6, 7, 8, および14を包含するが、遺伝子16を包含しない、配列決定された

すべてのIFN- $\alpha$ 遺伝子(Hencoら、J. Mol. Biol. 185:227-260, 1985)に対して相同性である：

TCT CTG TCC TCC ATG A

(配列番号86)

HRBZはTGTCヘアピン中のT残基の後で、上に下線で示す、リボザイムのループ5基質のモチーフを切断するように設計する。切断後、HRBZを再循環させ、そしてHRBZは他のIFN- $\alpha$ mRNA分子にハイブリダイゼーションし、そしてそれを切断することができる。

従来定められた二本鎖HRBZ (Hampelら、Nucleic Acids Research 18:299-304, 1990)は、4塩基のテトラループ3および延長したらせん4を含有し、上に示したIFN- $\alpha$ mRNAに対する特異性を持ち、化学的に合成されそして、それぞれ、Cla I およびXho I 部位を、それぞれ、5' および3' 末端に含む。化学的に合成されたIFN- $\alpha$ HRBZ鎖の配列を下に示す：

IFN- $\alpha$ HRBZ、センス鎖 (5'  $\rightarrow$  3' ) :

TCG AGT CAT GGA GAG AGG AGA ACC AGA GAA ACA CAC GGA CT

T CGG TCC GTG GTA TAT TAC CTG GAT

(配列番号87)

IFN- $\alpha$ HRBZ、アンチセンス鎖 (5'  $\rightarrow$  3' ) :

CGA TCC AGG TAA TAT ACC ACG GAG CGA AGT CCG TGT GTT TCT

CTG GTT C TC CTC TCT CCA TGA C

(配列番号88)

Cla I およびXho I の粘着末端をもつ二本鎖IFN- $\alpha$  特異的HRBZを形成するために、等しい量のオリゴヌクレオチドを10mMのMg<sup>2+</sup> 中で一緒に混合し、95℃に5分間加熱し、次いで室温にゆっくり冷却して鎖をアニーリングさせる。

Cla I およびXho I 粘着末端をもつ二本鎖IFN- $\alpha$ HRBZをpKS II'

プラスミドベクターの中に結合し、ここでpKS II' ベクターはCla I およびXho I で消化し、CIAPで処理し、そしてジーン・クリーン (Gene Clean<sup>®</sup>) で処理して調製される。このプラスミドをpKSIFN $\alpha$ HRBZと表示する。

IFN- $\alpha$  ヘアピンリボザイム部分をそれらのプラスミドベクター、それぞれ、pKSIFN $\alpha$ HRBZから遊離させる、ここでCla I およびXho I で消化し、2%NuSieve/アガロース電気泳動およびジーン・クリーン (Gene Clean<sup>®</sup>) により精製し、そしてそれらを所望のベクターの主鎖の中に挿入し、ここでベクターの主鎖はCla I およびXho I を使用する消化およびCIAPを使用する処理により調製する。いくつかの可能なシンジスベクターはIFN- $\alpha$  ヘアピンリボザイム部分の挿入のために適当であり、それらのいくつかを下に示し、そしてそれらの詳細な構成は実施例2、3、および4に記載されている：

ベクター	機能的接合領域 (+/-)
pKSSINBV	+
pKSSINBVd1JR	-
pKSSINd1JRsjrc	+
pKSSINd1JRsjrPC	+
pKSSINd1JRsjrNP(7582-7601)	+
pKSSINd1JRsexjr	+
pKSSINd1JRsjrcAdE3	+
pKSSINd1JRsjrch301	+

リボザイム活性はRNAのレベルで働くので、この領域は部分的サブゲノムmRNAとして発現されることは不必要である。しかしながら、機械的接合領域の下流に配置するとき、合成されるリボザイムのレベルはIFN- $\alpha$ RNA標的を切断するとき非



常により大きくそして多分

いっそう有効である。

さらに、いくつかの応用、例えば、タンパク質の系統的発現において、個体への多数の投与量の投与が要求される。これらの応用において、ベクター感染細胞に向かってターゲッティングされた免疫応答の誘発なしの治療緩和因子の延長した発現は望ましい。この立体配置において、IFN- $\alpha$ HRBZ部分はアデノウイルスE3またはヒトサイトメガロウイルスのH301遺伝子の下流に挿入することができ、ここでE3およびH301遺伝子は感染した細胞におけるMHCクラスI分子の発現をダウンレギュレーションする。MHCクラスI分子の発現を変調する遺伝子の後に、連続的に、実施例5に記載する群の間から選択されるIRES要素、および治療緩和因子が存在する。ベクター接合領域と3'末端との間にベクターの中に位置する多重クロニング配列に沿ったヘアピンリボザイム、Ad E3またはCMV H301、IRES、および問題の異種遺伝子の成分の規則挿入は、成分5'および3'末端の適当な制限酵素認識部位を使用する修飾により達成される。これらの構成体において、機能的IFN- $\alpha$ ヘアピンリボザイムの緩和因子はサブゲノムおよびプラス鎖ゲノムの両方のシンドビスベクターRNAのレベルで存在するであろう。

#### 実施例20

##### 組換えアルファウイルスのベクターのラクトース配合物

粗製の組換えアルファウイルスのベクターはセリガン (Celligan) バイオリアクター (New Brunswick、ニュージャージー州) から入手し、組換えアルファウイルスのベクターでトランスフェクションまたは形質導入されたパッケージング細胞を含有し、そしてバイオリアクターのマトリックスのビーズに結合されている。細胞は、連続的流れプロセスにおいて細胞の上を通る成長培地の中に、組換えアルファウイルスのベクターを解放する。バイオリアクターを出

る培地を集め、そして最初に0.8ミクロンのフィルター、次いで0.65ミクロンのフィルターに通過させて、粗製の組換えアルファウイルスのベクターを清浄化する。交差流濃縮システム (Filltron、マサチューセッツ州ボストン) を利用して、

濾液を濃縮する。濃縮物の1 mlにつきほぼ50単位のDNアーゼ (Intergen、ニューヨーク州ニューヨーク) を添加して、外因性DNAを消化する。消化物を同一の交叉流システムで150mMのNaCl、25mMのトロメタミン、pH7.2に対して透析濾過する。50mMのNaCl、25mMのトロメタミン、pH7.4中で平衡化した、セファデックス (Sephadex) S-500ゲルカラム (Pharmacia、ニュージャージー州ピスカタエイ) 上に透析濾過物を負荷する。精製した組換えアルファウイルスのベクターを50mMのNaCl、25mMのトロメタミン、pH7.4中でセファデックス (Sephadex) S-500ゲルカラムから溶離する。

ラクトースを含有する配合緩衝液を2×濃縮原溶液として調製した。配合緩衝液は、25mMのトロメタミン、70mMのNaCl、2 mg/mlのアルギニン、10mg/mlのヒト血清アルブミン(HSA)、および100mg/mlのラクトースを100mlの最終体積でpH7.4において含有する。

1部のS-500精製した組換えアルファウイルスのベクターに1部の2×ラクトース配合緩衝液を添加することによって、精製した組換えアルファウイルスのベクターを配合する。配合した組換えアルファウイルスのベクターは-70℃~-80℃において構造するか、あるいは乾燥することができる。

スーパーモデュリョ (Supermodulyo) 12K凍結乾燥器に取り付けられたエドワーズ・レフリジェレイテッド・チャンバー (Edwards Refrigerated Chamber) (3Shelf RC3Sユニット) (Edwards High Vacuum、ニューヨーク州トナワンダ) 中で、配合したアルファウイルスを凍結乾燥する。凍結乾燥サイクルが完結したとき、わずかの

窒素ガスの抽出後真空下にバイアルに栓をする。取り出したとき、バイアルをアルミニウムのシールでクリンプする。凍結乾燥した組換えレトロウイルスを1.0mlの水で再構成する。

以上から理解されるように、本発明の特定の態様を例証の目的で記載したが、本発明の精神および範囲から逸脱しないで種々の変更が可能である。したがって、本発明は添付した請求の範囲により以外限定されない。

## SEQUENCE LISTING

- (1) GENERAL INFORMATION:
- (i) APPLICANT:
- NAME: Viagene, Inc.
- STREET: 11055 Roselle Street
- CITY: San Diego, California
- COUNTRY: US
- POSTAL CODE: 92121
- TELEPHONE: (619) 452-1288
- (ii) TITLE OF INVENTION: RECOMBINANT ALPHAVIRUS VECTORS
- (iii) NUMBER OF SEQUENCES: 89
- (iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:
- (A) ADDRESSEE: Seed and Berry
- (B) STREET: 6300 Columbia Center, 701 Fifth Avenue
- (C) CITY: Seattle
- (D) STATE: Washington
- (E) COUNTRY: US
- (F) ZIP: 98104-7092
- (v) COMPUTER READABLE FORM:
- (A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: Patent In Release #1.0, Version #1.25
- (vi) CURRENT APPLICATION DATA:
- (A) APPLICATION NUMBER:
- (B) FILING DATE:
- (C) CLASSIFICATION:

## (viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:

(A) NAME: McMasters, David D.

(B) REGISTRATION NUMBER: 33,963

(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: 930049.423PC

## (ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:

(A) TELEPHONE: (206) 622-4900

(B) TELEFAX: (206) 682-6031

(C) TELEX: 3723836 SEEDANBERRY

## (2) 配列番号1についての情報:

## (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 24個の塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

## (xi) 配列: 配列番号1:

ATCTCTACGG TGGTCCTAAA TAGT

24

## (2) 配列番号2についての情報:

## (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 42個の塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

## (xi) 配列: 配列番号2:

TATATTCTAG ATTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTGAAA TG

42

## (2) 配列番号3についての情報:

## (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 48個の塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号 3 :

TATATGGGCC CGATTAGGT GACACTATAG ATTGACGGCG TAGTACAC 48

(2) 配列番号 4 についての情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 23個の塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号 4 :

CTGGCAACCG GTAAGTACGA TAC 23

(2) 配列番号 5 についての情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 21個の塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号 5 :

ATACTAGCCA CGGCCGGTAT C 21

(2) 配列番号 6 についての情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 21個の塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号 6 :

TCCTCTTTTCG ACGTGTCGAG C

21

(2) 配列番号 7 についての情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 21個の塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号 7 :

ACCTTGGAGC GCAATGTCCT G

21

(2) 配列番号 8 についての情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 21個の塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号 8 :

CCTTTTCAGG GGATCCGCCA C

21

(2) 配列番号 9 についての情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 21個の塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号 9 :

GTGGCGGATC CCCTGAAAAG G

21

(2) 配列番号 10 についての情報 :

## (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 19個の塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

## (xi) 配列: 配列番号10:

TGGGCCGTGT GGTCGCATG

19

## (2) 配列番号11についての情報:

## (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 21個の塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

## (xi) 配列: 配列番号11:

TGGGTCTTCA ACTCACCGGA C

21

## (2) 配列番号12についての情報:

## (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 22個の塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

## (xi) 配列: 配列番号12:

CAATTCGACG TACGCCTCAC TC

22

## (2) 配列番号13についての情報:

## (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 22個の塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号13：

GAGTGAGGCG TACGTCGAAT TG

22

(2) 配列番号14についての情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：35個の塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号14：

TATATCTCCA GATGAGGTAC ATGATTTTAG GCTTG

35

(2) 配列番号15についての情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：40個の塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号15：

TATATATCGA TTCAAGGCAT TTTCTTTTCA TCAATAAAAC

40

(2) 配列番号16についての情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：35個の塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号16：



TATATCTCCA GATGATGACA ATGTGGTGTG TGACG

35

(2) 配列番号17についての情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 32個の塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号17:

TATATATCGA TTCATGACGA CCGGACCTTGACG 32

(2) 配列番号18についての情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 28個の塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号17:

TATATGGGCC CCCCCCCCCC CCCCACG 28

(2) 配列番号19についての情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 30個の塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号19:

TATATATCGA TCCCCCCCCC CCCCCACG 30

(2) 配列番号20についての情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ : 34個の塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号20 :

TATATCCATG GCTTACAATC GTGGTTTTCA AAGG 34

(2) 配列番号21についての情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 33個の塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号21 :

TATATGGGCC CTCGATGAGT CTGGACGTTC CTC 33

(2) 配列番号22についての情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 33個の塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号22 :

TATATATCGA TTCGATGAGT CTGGACGTTC CTC 33

(2) 配列番号23についての情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 37個の塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号23：

TATATCCATG GATCCAATTT GCTTTATGAT AACCAATC

37

(2) 配列番号24についての情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：30個の塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号24：

TATATGGGCC CGGTCGACGC CGGCCAAGAC

30

(2) 配列番号25についての情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：30個の塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号25：

TATATATCGA TGGTCGACGC CGGCCAAGAC

30

(2) 配列番号26についての情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：32個の塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号26：

TATATCCATG GTGCCAGCCA GTTGGGCAGC AG

32

## (2) 配列番号27についての情報:

## (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 23個の塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

## (xi) 配列: 配列番号27:

TTAATTAACG GCCGCCACCA TGG

23

## (2) 配列番号28についての情報:

## (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 13個の塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

## (xi) 配列: 配列番号28:

TAACGGCCGC CAC

13

## (2) 配列番号29についての情報:

## (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 20個の塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

## (xi) 配列: 配列番号29:

CCATGGTGGC GGCCGTTAAT

20

## (2) 配列番号30についての情報:

## (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 12個の塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号30 :

GTCACCGGTG AC

12

(2) 配列番号31についての情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 25個の塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号31 :

CTCATCGATC AGATCTGACT AGTTG

25

(2) 配列番号32についての情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 33個の塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号32 :

GATCCTCACTA GTCAGATCTG ATCGATGAGG GCC

33

(2) 配列番号33についての情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 56個の塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列：配列番号33：

ACTTATCGAT GGTTCCTAGAC TCCCTTAGCC ATCCGAGTGG ACGTGCCTCC 50  
TCCTTC 56

(2) 配列番号34についての情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：52個の塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号34：

TCCACCTCCT CGCGGTCCGA CCTGGGCATC CGAAGGAGGA CGCAGGTCCA 50  
CT 52

(2) 配列番号35についての情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：57個の塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号35：

TCGGACCGCG AGGAGGTGGA GATGCCATGC CGACCCATTG ACGGCGTAGT 50  
ACACACT 57

(2) 配列番号36についての情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：36個の塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号36：

CTGGACTAGT TAATACTGGT GCTCGGAAAA CATTCT 36

(2) 配列番号37についての情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：40個の塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号37：

GTCAGCTTG CTAGCTACAA CACCACCACC ATGAATAGAG 40

(2) 配列番号38についての情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：47個の塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号38：

TATATGCGGC CGCACCACCA CCATGAATAG AGGATTGTTT AACATGC 47

(2) 配列番号39についての情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：34個の塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号39：

TATATGCGGC CGCTCATCTT CGTGTGCTAG TCAG 34

(2) 配列番号40についての情報：

(i) 配列の特徴：塩基配列は、以下の通りである。

(A) 長さ：61個の塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号40：

TATATGCGGC CGCATCTCTA CGGTGGTCCT AAATAGTACC ACCACCATGA 50  
ATAGAGGATT C 61

(2) 配列番号41についての情報：

(i) 配列の特徴：塩基配列は、以下の通りである。

(A) 長さ：40個の塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号41：

CAGTCTCGAG TTACTACCAC TCTTCTGTCC CTTCGGGGT 40

(2) 配列番号42についての情報：

(i) 配列の特徴：塩基配列は、以下の通りである。

(A) 長さ：43個の塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号42：

TATATGCGGC CGCACCACCA TGTCGCAGC ACCACTGGTC ACG 43

(2) 配列番号43についての情報：

(i) 配列の特徴：塩基配列は、以下の通りである。

(A) 長さ：34個の塩基対



(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号43 :

TATATAGATC TCTTGATCAG CTTCAGAAGA TGGC

34

(2) 配列番号44についての情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 24個の塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号44 :

TCAATGGCGG GAAGAGGCGG TTGG

24

(2) 配列番号45についての情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 31個の塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号45 :

CCGCCTCTTC CCGCCATTGA CGGCGTAGTA C

31

(2) 配列番号46についての情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 23個の塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号46 :

CTGGCAACCG GTAAGTACGA TAC

23

(2) 配列番号47についての情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 34個の塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号47 :

TATATAGATC TCTTGATCAG CTCAGAAGA TGGC

34

(2) 配列番号48についての情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 22個の塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号48 :

GGTAACAAGA TCTCGTGCCG TG

22

(2) 配列番号49についての情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 40個の塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号49 :

TATATGCGGC CGCACCGCCA AGATGTTCCC GTTCCAGCCA

40

(2) 配列番号50についての情報 :

## (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 34個の塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

## (xi) 配列: 配列番号50:

TATATGCGGC CGCTCAATTA TGTTTCTGGT TGGT 34

## (2) 配列番号51についての情報:

## (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 35個の塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

## (xi) 配列: 配列番号51:

CTCGAGCTCG AGGCACCAGC ACCATGCAAC TTTT 35

## (2) 配列番号52についての情報:

## (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 29個の塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

## (xi) 配列: 配列番号52:

CTACTAGATC CCTAGATGCT GGATCTTCC 29

## (2) 配列番号53についての情報:

## (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 29個の塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号53：

GGAAGATCCA GCATCTAGGG ATCTAGTAG 29

(2) 配列番号54についての情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：26個の塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号54：

GGGCGATATC AAGCTTATCG ATACCG 26

(2) 配列番号55についての情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：35個の塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号55：

CTCGAGCTCG AGGCACCAGC ACCATGCAAC TTTT 35

(2) 配列番号56についての情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：26個の塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号56：

GGGCGATATC AAGCTTATCG ATACCG

26

(2) 配列番号57についての情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 19個の塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号57:

AATACGACTC ACTATAGGG

19

(2) 配列番号58についての情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 29個の塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号58:

CTACTAGATC CCTAGATGCT GGATCTTCC

29

(2) 配列番号59についての情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 17個の塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号59:

ATTAACCCTC ACTAAAG

17

(2) 配列番号60についての情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ : 29個の塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号60 :

GGAAGATCCA GCATCTAGGG ATCTAGTAG 29

(2) 配列番号61についての情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 17個の塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号61 :

ATTAACCCTC ACTAAAG 17

(2) 配列番号62についての情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 19個の塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号62 :

AATACGACTC ACTATAGGG 19

(2) 配列番号63についての情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 34個の塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号63：

CCTCGAGCTC GAGCTTGGGT GGCTTTGGGG CATG 34

(2) 配列番号64についての情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：17個の塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号64：

ATTACCCCTC ACTAAAG 17

(2) 配列番号65についての情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：52個の塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号65：

TCCACCTCCT CGCGGTCCGA CCTGGGCATCCGAAGGAGGA CGCACGTCCA 50  
CT 52

(2) 配列番号66についての情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：56個の塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号66：

ACTTATCGAT GGTTCCTAGAC TCCCTTAGCC ATCCGAGTGG ACGTGCGTCC 50

TCCTTC 56

(2) 配列番号67についての情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 57個の塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号67:

TCGGACCGCG AGGAGGTGGA GATGCCATGCCGACCCATTG ACGGCGTAGT 50

ACACACT 57

(2) 配列番号68についての情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 36個の塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号68:

CTGGACTAGTCTAATACTGGTGCTCGGAAAA CATTCT 36

(2) 配列番号69についての情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 33個の塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号69:

TTTCTGGCTC CAGCCAAAGC CACCCTAGGG GAG 33



## (2) 配列番号70についての情報:

## (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 33個の塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

## (xi) 配列: 配列番号70:

AATGGAGTAG CCAGGTGAGA TTGTCTCCAGGAA 33

## (2) 配列番号71についての情報:

## (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 44個の塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

## (xi) 配列: 配列番号71:

CGCGCGGGCC CTGTGACATT GAATAGAGTGAGGGTCCTGT TGGG 44

## (2) 配列番号72についての情報:

## (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 45個の塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

## (xi) 配列: 配列番号72:

AAAGGTTTCA CATTGTAGC TTGCTGTGTCATTGCCGATCTCTACG 45

## (2) 配列番号73についての情報:

## (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 45個の塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号73 :

GTGGTCCTAA ATAGTTCACT CTATTCAATGCTCACA CTGCGA GCCGG 45

(2) 配列番号74についての情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 33個の塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号74 :

TTTCTGGCTC CAGCCAAAGC CACCCTAGGG GAG 33

(2) 配列番号75についての情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 33個の塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号75 :

AATGGAGTAG CCAGGTGAGA TTGTCTCCAG GAA 33

(2) 配列番号76についての情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 33個の塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号76 :

TATATTCTAG AGCAAGCAAC AGTTACTGCG ACG

33

(2) 配列番号77についての情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 33個の塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号77 :

TATATATCGA TCCGAAGCGT AGAGTCACAC TTG

33

(2) 配列番号78についての情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 18個の塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号78 :

TTAACTGTCA AAAGCCAC

18

(2) 配列番号79についての情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 68個の塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号79 :

CGATGTGGCT TTAGATGTT AAACCAGAGA AACACACGGA CTCGGTCCG 50

TGGTATATTA GCTGGTAT

68

## (2) 配列番号80についての情報:

## (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 70個の塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

## (xi) 配列: 配列番号80:

CTAGATACCA GCTAATATAC CACGGACCGA AGTCCGTGTG TTTCTCTGGT 50  
TTAACATCTA AAAGCCACAT 70

## (2) 配列番号81についての情報:

## (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 33個の塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

## (xi) 配列: 配列番号81:

TATATTCTAG AGCAAGCAAC AGTTACTGCG ACG 33

## (2) 配列番号82についての情報:

## (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 33個の塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

## (xi) 配列: 配列番号82:

TATATATCGA TCCGAAGCGT AGAGTCACAC TTG 33

## (2) 配列番号83についての情報:

## (i) 配列の特徴:

(A) 長さ : 18個の塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号83 :

TTAACTGTCA AAAGCCAC

・ 配列番号83の塩基対の長さ : 18

(2) 配列番号84についての情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 68個の塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号84 :

GGCGATGTGGCT TTTAGATGTT AAACCAGAGA AACACACGGA!CTTCGGTCCG 50

TGGTATATTA GCTGGTAT

・ 配列番号84の塩基対の長さ : 68

(2) 配列番号85についての情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 70個の塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号85 :

CTAGATACCA GCTAATATAC CACGGACCGA AGTCCGTGTG!TTCTCTGGT 50

TTAACATCTA AAAGCCACAT

・ 配列番号85の塩基対の長さ : 70

(2) 配列番号86についての情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 16個の塩基対

(xi) 配列：配列番号86：

(2) 配列番号87についての情報: 20010101 10:15:11

(D) トポロジー：直鎖状

GGTATATTACTCTGGAT... 66

(D) トポロジー：直鎖状

CCTCTCTCCA TGAC 64

(B)型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

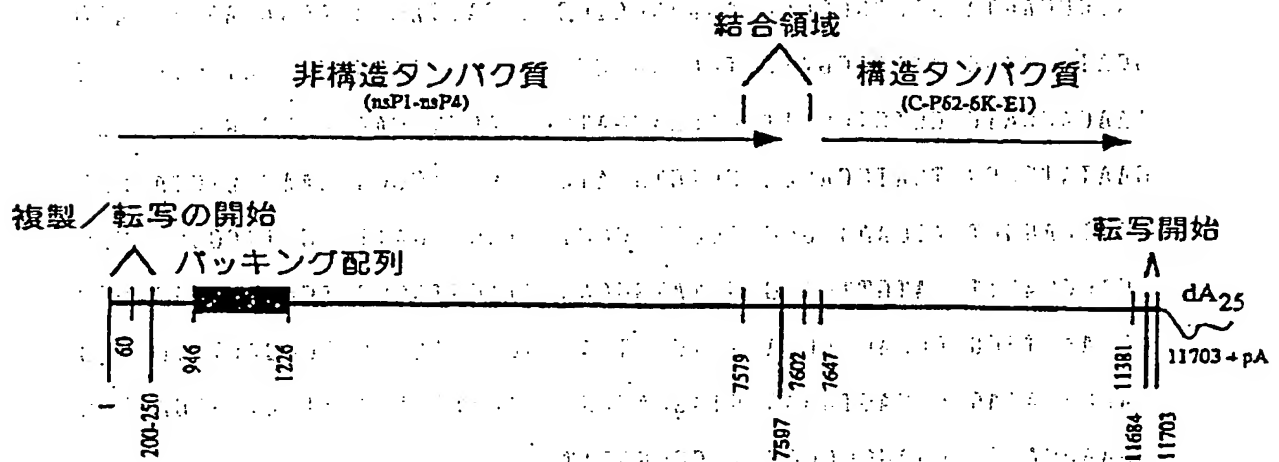
(xi) 配列：配列番号89：

```
ATTGACGGCG TAGTACACAC TATTGAATCA AACAGCCGAC CAATCGCACT 50
ACCATCACAA TGGAGAAGCC AGTAGTAAAC GTAGACGTAG ACCCCCAGAG 100
TCCGTTTGTC GTGCAACTGC AAAAAAGCTT CCCGCAATTT GAGGTAGTAG 150
CACAGCAGGT CACTCCAAAT GACCATGCTA ATGCCAGAGC ATTTTCGCAT 200
CTGGCCAGTA AACTAATCGA GCTGGAGGTT CCTACCACAG CGACGATCTT 250
GGACATAGGC AGCGCACCGG CTCGTAGAAT GTTTTCCGAG CACCAGTATC 300
ATTGTGTCTG CCCCATGCGT AGTCCAGAAG ACCCGGACCG CATGATGAAA 350
TATGCCAGTA AACTGGCGGA AAAAGCGTGC AAGATTACAA ACAAGAACTT 400
GCATGAGAAG ATTAAGGATC TCCGGACCGT ACTTGATACG CCGGATGCTG 450
AAACACCATC GCTCTGCTTT CACAACGATG TTACCTGCAA CATGCGTGCC 500
GAATATTCCG TCATGCAGGA CGTGTATATC AACGCTCCCG GAACTATCTA 550
TCATCAGGCT ATGAAAGGCG TCGGGACCCT GTA CTGGATT GGCTTCGACA 600
CCACCCAGTT CATGTTCTCG GCTATGGCAG GTTCGTACCC TCGGTAGAAC 650
ACCAACTGGG CCGACGAGAA AGTCCTTGAA GCGCGTAACA TCGGACTTTG 700
CAGCACAAAG CTGAGTGAAG GTAGGACAGG AAAATTGTCG ATAATGAGGA 750
AGAAGGAGTT GAAGCCCGGG TCGCGGGTTT 780
```

【図1】

FIGURE 1

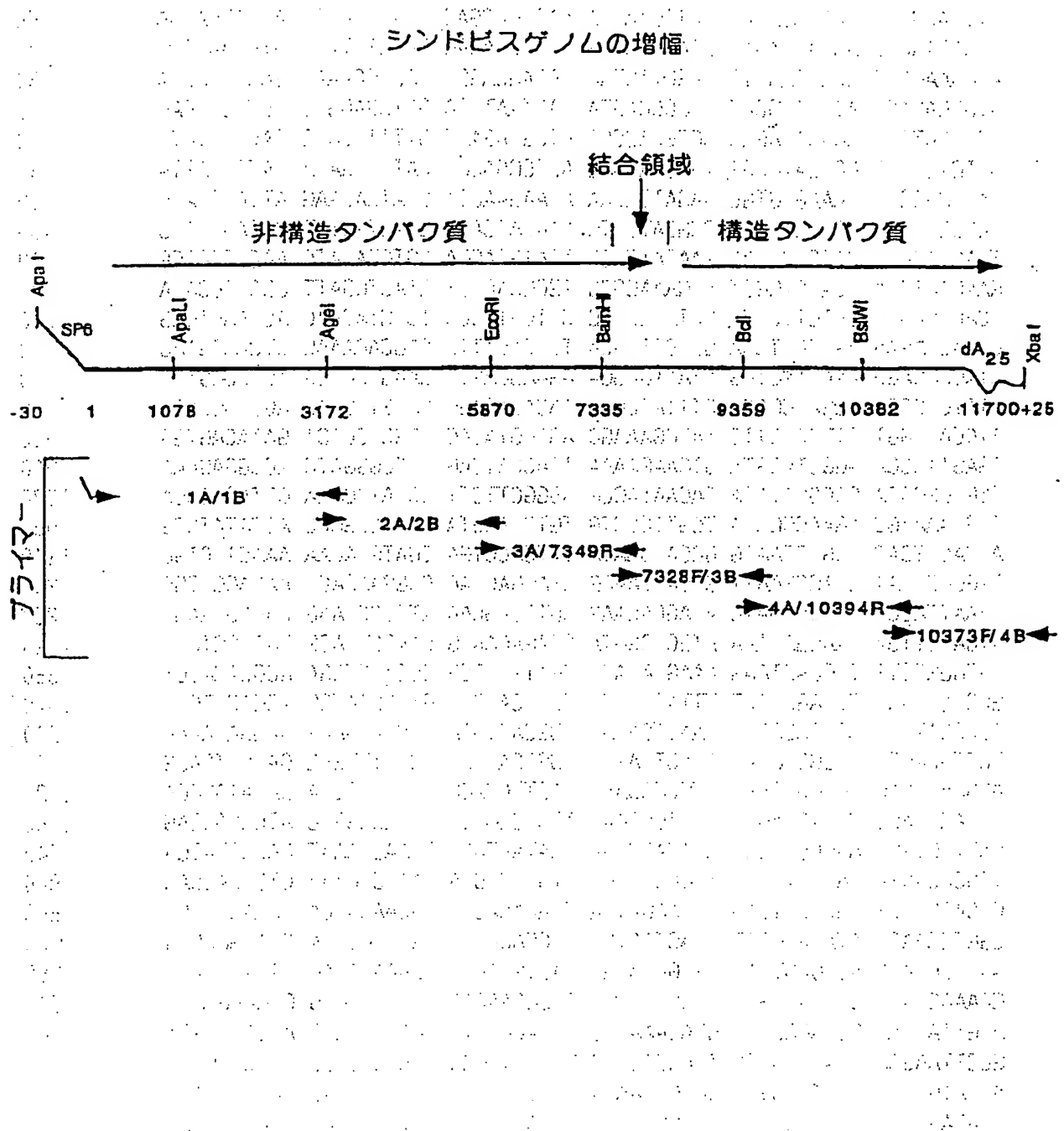
## シンドビスウイルスゲノム組成





【図2】

FIGURE 2



【图3】

## FIGURE 3 A

ATTGACGGCG	TAGTACACAC	TATTGAATCA	AACAGCCGAC	CAATCGCACT	ACCATCACAA	60
TGGAGAAGCC	AGTAGTAAAC	GTAGACGTAG	ACCCCCAGAG	TCCGTTTGTC	GTGCAACTGC	120
AAAAAAGCTT	CCCGCAATTT	GAGGTAGTAG	CACAGCAGGT	CACTCCAAAT	GACCATGCTA	180
ATGCCAGAGC	ATTTTCGCAT	CTGGCCAGTA	AACTAATCGA	GCTGGAGGTT	CCTACCACAG	240
CGACGATCTT	GGACATAGGC	AGCGCACC GG	CTCGTAGAAT	GTTTTCCGAG	CACCAGTATC	300
ATTGTGTCTG	CCCCATGCGT	AGTCCAGAAG	ACCCGGACCG	CATGATGAAA	TATGCCAGTA	360
AACTGGCGGA	AAAAGCGTGC	AAGATTACAA	ACAAGAACTT	GCATGAGAAG	ATTAAGGATC	420
TCCGGACCGT	ACTTGATACG	CCGGATGCTG	AAACACCATC	GCTCTGCTTT	CACAACGATG	480
TTACCTGCAA	CATGCGTGCC	GAATATTCGG	TCATGCAGGA	CGTGTATATC	AACGCTCCCG	540
GAACTATCTA	TCATCAGGCT	ATGAAAGGCG	TGCGGACCTT	GTAATGGATT	GGCTTCGACA	600
CCACCCAGTT	CATGTTCTCG	GCTATGGCAG	GTTCTGACCC	TGCGTACAAC	ACCAACTGGG	660
CCGACGAGAA	AGTCCTTGAA	GCGCGTAACA	TCGGACTTTG	CAGCACAAAG	CTGAGTGAAG	720
GTAGGACAGG	AAAATTGTCT	ATAATGAGGA	AGAAGGAGTT	GAAGCCCGGG	TCGCGGGTTT	780
ATTTCTCCGT	AGGATCGAGA	CTTTATCCAG	AACACAGAGC	CAGCTTGCGAG	AGCTGGCATC	840
TTCCATCGGT	GTTCCACTTG	AATGGAAAAG	AGTCGTACAC	TTGCCGCTGT	GATACAGTGG	900
TGAGTTGCGA	AGGCTACGTA	GTGAAGAAAA	TCACCATCAG	TCCCAGGATC	ACGGGAGAAA	960
CCGTGGGATA	CGCGGTTACA	CACAATAGCG	AGGGCTTCTT	GCTATGCAAA	GTTACTGACA	1020
CAGTAAAAGG	AGAACGGGTA	TCGTTCCCTG	TGTGCACGTA	CATCCCGGCC	ACCATATGCG	1080
ATCAGATGAC	TGGTCTAATG	GCCACGBATA	TATCACCTGA	CGATGCACAA	AAACTTCTGG	1140
TTGGGCTCAA	CCAGCGAATT	GTCAATTAACG	GTAGGACTAA	CAGGAACACC	AACACCATGC	1200
AAAATTACCT	TGTGCCGATC	ATAGCACAAAG	GGTTCAGCAA	ATGGGCTAAG	GAGCGCAAGG	1260
ATGATCTTGA	TAACGAGAAA	ATGCTGGGTA	CTAGAGAACG	CAAGCTTACG	TATGGCTGCT	1320
TGTGGGCGTT	TCGCACTAAG	AAAGTACATT	CGTTTTATCG	CCCACCTGGA	ACGCAGACCT	1380
GCGTAAAAGT	CCCAGCCTCT	TTAGCGCTT	TCCCATGTC	GTCCGTATGG	ACGACCTCTT	1440
TGCCCATGTC	GCTGAGGCAG	AAATTGAAAC	TGGCATTGCA	ACCAAAGAAG	GAGGAAAAAC	1500
TGCTGCAGGT	CTCGGAGGAA	TTAGTCATGG	AGGCCAAGGC	TGCTTTTGAG	GATGCTCAGG	1560
AGGAAGCCAG	AGCGGAGAAG	CTCCGAGAAG	CACTTCCACC	ATTAGTGGCA	GACAAAGGCA	1620
TCGAGGCAGC	CGCAGAAGTT	GTCTGCGAAG	TGGAGGGGCT	CCAGGCGGAC	ATCGGAGCAG	1680
CATTAGTTGA	AACCCCGCGC	GGTCACGTAA	GGATAATACC	TCAAGCAAAT	GACCGTATGA	1740
TCGGACAGTA	TATCGTTGTC	TCGCCAAACT	CTGTGCTGAA	GAATGCCAAA	CTCGCACCAG	1800
CGCACCCGCT	AGCAGATCAG	GTTAAGATCA	TAACACACTC	CGGAAGATCA	GGAAGGTACG	1860
CGGTGCAACC	ATACGACGCT	AAAGTACTGA	TGCCAGCAGG	AGGTGCCGTA	CCATGGCCAG	1920
AATTCCTAGC	ACTGAGTGAG	AGCGCCACGT	TAGTGTACAA	CGAAAAGAGAG	TTTGTGAACC	1980
GCAAACATA	CCACATTGCC	ATGCATGGCC	CCGCCAAGAA	TACAGAAGAG	GGGCAGTACA	2040
AGGTTACAAA	GGCAGAGCTT	GCAGAAACAG	AGTACGTGTT	TGACGTGGAC	AAGAAGCGTT	2100
GCGTTAAGAA	GGAAGAAGCC	TCAGGTCTGG	TCCTCTCGGG	AGAACTGACC	AACCTCCCT	2160
ATCATGAGCT	AGCTCTGGAG	GGACTGAAGA	CCCACCTGC	GGTCCCGTAC	AAGGTCGAAA	2220
CAATAGGAGT	GATAGGCACA	CCGGGGTCGG	GCAAGTCCGC	TATTATCAAG	TCAACTGTCA	2280

【图3】

## FIGURE 3 B

CGGCACGAGA TCTTGTACC AGCGGAAAGA AAGAAAATTG TCGCGAAATT GAGGCCGACG 2340  
 TGCTAAGACT GAGGGGTATG CAGATTACGT CGAAGACAGT AGATTGCGTT ATGCTCAACG 2400  
 GATGCCACAA AGCCGTAGAA GTGCTGTACG TTGACGAAGC GTTCGCGTGC CACGCAGGAG 2460  
 CACTACTTGC CTTGATTGCT ATCGTCAGGC CCCGCAAGAA GGTAGTACTA TGGGAGACCG 2520  
 CCATGCAATG CGGATCTTC AACATGATGC AACTAAAGGT ACATTTCAAT CAGCCTGAAA 2580  
 AAGACATATG CACCAAGACA TTCTACAAGT ATATCTCCCG GCGTTGCACA CAGCAGTTA 2640  
 CAGCTATTGT ATCGACACTG CATTACGATG GAAAGATGAA AACGACGAAC CCGTGCAAGA 2700  
 AGAACATTGA AATCGATATT ACAGGGGCCA CAAAGCCGAA GCCAGGGGAT ATCATCCTGA 2760  
 CATGTTTCCG CGGGTGGGT AAGCAATTGC AAATCGACTA TCCCGGACAT GAAGTAATGA 2820  
 CAGCCGCGGC CTCACAAGGG CTAACCAGAA AAGGAGTGTA TGCCGTCCGG CAGAAAGTCA 2880  
 ATGAAAACCG ACTGTACGGC ATCACATCAG AGCATGTGAA CGTGTGCTC ACCGCACTG 2940  
 AGGACAGGCT AGTGTGAAA ACCTTGACGG GCGACCCATG GATTAAAGCAG CTCACTAACA 3000  
 TACCTAAAGG AAACTTTCAG GCTACTATAG AGGACTGGGA AGCTGAACAG AAGGGAATAA 3060  
 TTGCTGCAAT AAACAGCCCC ACTCCCGGTG CCAATCCGTT CAGCTGCAAG ACCAACGTTT 3120  
 GCTGGGCGAA AGCATTGGAA CCGATACTAG CCACGGCCGG ATATCGTACTT ACCGTTGCGA 3180  
 AGTGGAGCGA ACTGTTCCCA CAGTTTGCGG ATGACAAAGC ACATTCGGCC ATTTACGCCT 3240  
 TAGACGTAAT TTGCATTAAG TTTTTCGGCA TGGACTTGAC AAGCGGACTG TTTTCTAAAC 3300  
 AGAGCATCC ACTAACGTAC CATCCCGCGG ATTCAGCGAG GCCGGTAGCT GATTGGGACA 3360  
 ACAGCCCAGG AACCCGCAAG TATGGGTACG ATCAGGCCAT TGCCGCGGAA CTCTCCCGTA 3420  
 GATTTCCGGT GTTCCAGCTA GCTGGGAAGG GCACACAAC TGAATTGCAG ACCGGGAGAA 3480  
 CCAGAGTTAT CTCTGCACAG CATAACCTGG TCCCGGTGAA CCGCAATCTT CCTCAGCCT 3540  
 TAGCCCCGA GTACAAGGAG AAGCAACCCG GCCCGGTGCA AAAATTCTTG AACAGTTCA 3600  
 AACACCACTC AGTACTTGTG GTATCAGAGG AAAAAATTGA AGCTCCCGGT AAGAGAATCG 3660  
 AATGGATCGC CCCGATTGGC ATAGCCGGTG CAGATAAGAA CTACAACCTG GETTTCGGGT 3720  
 TTCCGCCGCA GGCACGGTAC GACCTGGTGT TCATCAACAT TGGAACTAAA TACAGAAACC 3780  
 ACCACTTTCA GCAGTGCAG GACCATGCGG CGACCTTAAA AGCCCTTTCG CGTTCGGCCC 3840  
 TGAATTGCCT CAACCCAGGA GGCACCCTCG TGGTGAAGTC CTATGGGTAC GCCACCGCA 3900  
 ACAGTGAGGA CGTAGTCACC GCTCTTGCCA GAAAGTTGT CAGGGTGTCT GCACGAGAC 3960  
 CAGATTGTGT CTCAAGCAAT ACAGAAATGT ACCTGATTTT CCGACAATA GACAACAGCC 4020  
 GTACACGGCA ATTCACCCCG CACCATCTGA ATTGCGTGAT TTCGTCCGTG TATGAGGGTA 4080  
 CAAGAGATGG AGTTGGAGCC GCGCCGTGAT ACCGCACCA AAGGGAGAAT ATTGCTGACT 4140  
 GTCAAGAGGA AGCAGTTGTC AACGCAGCCA ATCCGCTGGG TAGACCAGGC GAAGGAGTCT 4200  
 GCGGTGCCAT CTATAAACGT TGGCCGACCA GTTTTACCGA TTCAGCCACG GAGACAGGCA 4260  
 CCGCAAGAAT GACTGTGTGC CTAGGAAAGA AAGTGATCCA CGCGGTCGGC CCTGATTTCC 4320  
 GGAAGCACCG AGAAGCAGAA GCCTTGAAAT TGCTACAAAA CGCCTACCAT GCASTGGCAG 4380  
 ACTTAGTAAA TGAACATAAC ATCAAGTCTG TCGCCATTCC ACTGCTATCT ACAGGCATTT 4440  
 ACGCAGCCGG AAAAGACCGC CTTGAAGTAT CACTTAACTG CTTGACAACC GCGTAGACA 4500  
 GAACTGACGC GGACGTAACC ATCTATTGCC TGGATAAGAA GTGGAAGGAA AGAATCGACG 4560

【图 3】

## FIGURE 3 C

CGGCACTCCA ACTTAAGBAG TCTGTAACAG AGCTGAAGGA TGAAGATATG GAGATCGACG 4620  
 ATGAGTTAGT ATGGATCCAT CCAGACAGTT GCTTGAAGGG AAGAAAGGGA TTCAGTACTA 4680  
 CAAAAGGAAA ATTGTATTCT TACTTCGAAG GCACCAAAAT CCATCAAGCA GCAAAAGACA 4740  
 TGGCGGAGAT AAAGGTCTCT TTCCCTAATG ACCAGGAAAG TAATGAACAA CTGTGTGCTT 4800  
 ACATATTGGG TGAGACCATG GAAGCAATCC GCGAAAAGTG CCCGGTCGAC CATAACCCGT 4860  
 CGTCTAGCCC GCCCAAAACG TTGCCGTGCC TTTGCATGTA TGCCATGACG CCAGAAAGGG 4920  
 TCCACAGACT TAGAAGCAAT AACGTCAAAG AAGTTACAGT ATGCTCCTCC ACCCCCCTTC 4980  
 CTAAGCACAA AATTAAGAAT GTTCAGAAGG TTCAGTGCAC GAAAGTAGTC CTGTTTAATC 5040  
 CGCACACTCC CGCATTCGTT CCCGCCCGTA AGTACATAGA AGTGCCAGAA CAGCCTACCG 5100  
 CTCCTCCTGC ACAGGCCGAG GAGGCCCCCG AAGTTGTAGC GACACCGTCA CCATCTACAG 5160  
 CTGATAACAC GTCGCTTGAT GTCACAGACA TCTCACTGGA TATGGATGAC AGTAGCGAAG 5220  
 GCTCACTTTT TTCGAGCTTT AGCGGATCGG ACAACTCTAT TACTAGTATG GACAGTTGGT 5280  
 CGTCAGGACC TAGTTCACTA GAGATAGTAG ACCGAAGGCA GGTGGTGGTG GCTGACGTTT 5340  
 ATGCCGTCCA TGAGCCTGCC CCTATTCCAC CGCAAGGCT AAAGAAGATG GCCCGCCTGG 5400  
 CAGCGGCAAG AAAAGAGCCC ACTCCACCGG CAAGCAATAG CTCTGAGTCC CTCCACCTCT 5460  
 CTTTTGGTGG GGTATCCATG TCGCTCGGAT CAATTTTCGA CGGAGAGACG GCCCGCCAGG 5520  
 CAGCGGTACA ACCCCTGGCA ACAGGGGCCA CGGATGTGCC TATGTCTTTC GGATCGTTTT 5580  
 CCGACGGAGA GATTGATGAG CTGAGCCGCA GAGCAACTGA GTCCGAACCC GTCTGTGTTG 5640  
 GATCATTTGA ACCGGGCGAA GTGAACCTAA TTATATCGTC CGGATCAGCC GTATCTTTTC 5700  
 CACTACGCAA GCAGAGACGT AGACGCAGGA GCAGGAGGAC TGAATACTGA CTAACCGGGG 5760  
 TAGGTGGGTA CATATTTTCG ACGGACACAG GCCCTGGGCA CTTGCAAAAG AAGTCCGTTT 5820  
 TGCAGAACCA GCTTAGAGAA CCGACCTTGG AGCGCAATGT CCGGAAAGA ATTATGCCC 5880  
 CGGTGCTCGA CACGTGAAA GAGGAACAAC TCAAACTCAG GTACCAGATG ATGCCACCG 5940  
 AAGCCAACAA AAGTAGGTAC CAGTCTCGTA AAGTAGAAAA TCAGAAAGCC ATAACCACTG 6000  
 AGCGACTACT GTCAGGACTA CGACTGTATA ACTCTGCCAC AGATCAGCCA GAATGCTATA 6060  
 AGATCACCTA TCCGAAACCA TTGTACTCCA GTAGCGTACC GCGGAACCTAC TCCGATCCAC 6120  
 AGTTGCTGT AGCTGTCTGT AACAACTATC TGCATGAGAA CTATCCGACA GTAGCATCTT 6180  
 ATCAGATTAC TGACGAGTAC GATGCTTACT TGGATATGGT AGACGGGACA GTCGCCTGCC 6240  
 TGGATACTGC AACCTTCTGC CCCGCTAAGC TTAGAAGTTA CCCGAAAAAA CATGAGTATA 6300  
 GAGCCCCGAA TATCCGAGT GCGGTTCCAT CAGCGATGCA GAACACGCTA CAAAATGTGC 6360  
 TCATTGCCGC AACTAAAAGA AATTGCAACG TCACGCAGAT GCGTGAAGT CCAACACTGG 6420  
 ACTCAGCGAC ATTCAATGTC GAATGCTTTC GAAAATATGC ATGTAATGAC GAGTATTGGG 6480  
 AGGAGTTTCG TCGGAAGCCA ATTAGGATTA CCACTGAGTT TGTACCGCA TATGTAGCTA 6540  
 GACTGAAAGG CCTAAGGCC GCCACACTAT TTGCAAGAC GTATAATTTG GTCCCATTTG 6600  
 AAGAAGTGCC TATGGATAGA TCGTCATGG ACATGAAAAG AGACGTGAAA GTTACACCAG 6660  
 GCACGAAACA CACAGAAGAA AGACGAAAG TACAAGTGAT ACAAGCCGCA GAACCCCTGG 6720  
 CGACTGCTTA CTTATGCGGG ATTCACCGGG AATTAGTGCG TAGGCTTACG GCCGTCTTGC 6780  
 TTCCAAACAT TCACACGCTT TTTGACATGT CGCGGAGGA TTTTGATGCA ATCATAGCAG 6840

【图3】

## FIGURE 3 D

AACACTTCAA GCAAGGCGAC CCGGTACTGG AGACGGATAT CGCATCATTC GACAAAAGCC 6900  
 AAGACGACGC TATGGCGTTA ACCGGTCTGA TGATCTTGA GGACCTGGGT GTGGATCAAC 6960  
 CACTACTCGA CTTGATCGAG TGGGCTTTG GAGAAATATC ATCCACCCAT CTACCTACGG 7020  
 GTACTCGTTT TAAATTCGGG GCGATGATGA AATCCGGAAT GTTCCTCACA CTTTTGTCA 7080  
 ACACAGTTTT GAATGTCGTT ATCGCCAGCA GAGTACTAGA AGAGCGGCTT AAAACGTCCA 7140  
 GATGTGCAGC GTTCATTGGC GACGACAACA TCATACATGG AGTAGTATCT GACAAAGAAA 7200  
 TGGCTGAGAG GTGCGCCACC TGGCTCAACA TGGAGGTTAA GATCATCGAC GCAGTCATCG 7260  
 GTGAGAGACC ACCTTACTTC TGGGCGGAT TTATCTTGCA AGATTGCGTT ACTTCCACAG 7320  
 CGTGCCGCGT GCGGGATCCC CTGAAAAGGC TGTTTAAGTT GGGTAAACCG CTCGCCAGCCG 7380  
 ACGACGAGCA AGACGAAGAC AGAAGACGCG CTCTGCTAGA TGAACAAAAG GCGTGGTTTA 7440  
 GAGTAGGTAT AACAGGCACT TTAGCAGTGG CCGTGACGAC CCGGTATGAG GTAGACAATA 7500  
 TTACACCTGT CCTACTGGCA TTGAGAACTT TTGCCAGAG CAAAAGAGCA TTCCAAGCCA 7560  
 TCAGAGGGGA AATAAAGCAT CTCTACGGTG GTCCTAAATA GTCAGCATAG TACATTTTAT 7620  
 CTGACTAATA CTACAACACC ACCACCATGA ATAGAGGATT CTTTAACATG CTCGGCCGCC 7680  
 GCCCTTCCCC GGGCCCACT GCCATGTGGA GGCGCGGAG AAGGAGGCAG GCGGCCCGA 7740  
 TGCCTGCCCG CAACGGGCTG GCTTCTCAA TGCAGCACT GACCACAGCC GTCAGTGCCC 7800  
 TAGTCATTGG ACAGGCAACT AGACCTCAAC CCCACGTCC ACGCCCGCCAT CCGGCCAGA 7860  
 AGAAGCAGGC GCCCAAGCAA CCACCGAAGC CGAAGAAACC AAAACGCAG GAGAAAGA 7920  
 AGAAGCAACC TGCAAAACCC AAACCGGAA AGAGACAGCG CATGGCACTT AAGTTGGAGG 7980  
 CCGACAGATT GTTCGACGTC AAGAACGAGG ACGGAGATGT CATCGGGCAC GCACTGGCCA 8040  
 TGGAAAGAAA GGTAATGAAA CCTCTGCACG TGAAGGAAC CATCGACCAC CCGTGCTAT 8100  
 CAAAGCTCAA ATTTACCAAG TCCTCAGCAT ACGACATGGA GTTCGCACAG TTGCCAGTCA 8160  
 ACATGAGAAG TGAGGCATTC ACCTACACCA GTGAACACCC CGAAGGATTC TATAACTGGC 8220  
 ACCACGGAGC GGTGCAGTAT AGTGGAGGTA GATTTAGCAT CCCTCGCGGA GTAGGAGGCA 8280  
 GAGGAGACAG CCGTGTCCG ATCATGGATA ACTCCGGTCG GGTGTGCGG ATAGTCCTCG 8340  
 GTGGCGCTGA TGAAGGAACA CGAACTGCCC TTTCGGTCGT CACCTGGAAT AGTAAAGGGA 8400  
 AGACAATTAA GACGACCCCG GAAGGGACAG AAGAGTGGTC CGCAGCACCA CTGGTCACGG 8460  
 CAATGTGTTT GCTCGGAAAT GTGAGTTCC CATGCGACCG CCCGCCACA TGCTATACCC 8520  
 GCGAACCTTC CAGAGCCCTC GACATCCTTG AAGAGAACGT GAACCATGAG GCCTACGATA 8580  
 CCCTGCTCAA TGCCATATTG CCGTGCGGAT CGTCTGGCAG AAGCAAAAGA AGCGTCGTTG 8640  
 ACGACTTTAC CCGTACCAGC CCGTACTTGG GCACATGCTC GTACTGCCAC CATACTGAAC 8700  
 CGTGCTTCAG CCCTGTTAAG ATCGAGCAGG TCTGGGACGA AGCGGACGAT AACACCATAC 8760  
 GCATACAGAC TTCCGCCAGC TTGGATACG ACCAAAGCGG AGCAGCAAGC GCAACAAGT 8820  
 ACCGCTACAT GTGCTTAA GAGGATCACA CCGTTAAAGA AGGCACCATG GATGACATCA 8880  
 AGATTAGCAC CTCAGGACCG TGTAAGAGG TTAGGTACAA AGGATACTTT CTCCTGCGAA 8940  
 AATGCCCTCC AGGGGACAGC GTAACGGTTA GCATAGTGAG TAGCAACTCA GCAACGTCAT 9000  
 GTACACTGGC CCGCAAGATA AAACAAAAT TCGTGGGACG GGAATAATAT GATCTACCTC 9060  
 CCGTTCACGG TAAAGAATT CCTTGACAG TGTACGACCG TCTGAAAACA ACTGCAGGCT 9120

【图3】

## FIGURE 3 E

ACATCACTAT	GCACAGGCCG	GGACCGCACG	CTTATACATC	CTACCTGGAA	GAATCATCAG	9180
GGAAAGTTTA	CGCAAAGCCG	CCATCTGGGA	AGAACATTAC	GTATGAGTGC	AAGTGC GGCG	9240
ACTACAAGAC	CGGAACCGTT	TCGACCCGCA	CCGAAATCAC	TGGTTGCACC	GCCATCAAGC	9300
AGTGCGTCGC	CTATAAGAGC	GACCAAACGA	AGTGGGTCTT	CAAGTCACCG	GACTTGATCA	9360
GACATGACGA	CCACACGGCC	CAAGGGAAAT	TGCATTTGCC	TTTCAAGTTG	ATCCCGGGTG	9420
CCTGCATGGT	CCCTGTTGCC	CAGCGCCCGA	ATGTAATACA	TGGCTTTAAA	CAGATCAGCC	9480
TCCAATTAGA	TACAGACCAC	TTGACATTGC	TCACCACCAG	GAGACTAGGG	GCAAACCCGG	9540
AACCAACCAC	TGAATGGATC	GTCGGAAAGA	CGGTCAGAAA	CTTCACCGTC	GACCGAGATG	9600
GCCTGGAATA	CATATGGGGA	AATCATGAGC	CAGTGAGGGT	CTATGCCCAA	GAGTCAGCAC	9660
CAGGAGACCC	TCACGGATGG	CCACACGAAA	TAGTACAGCA	TTACTACCAT	CGCCATCCTG	9720
TGTACACCAT	CTTAGCCGTC	GCATCAGCTA	CCGTGGCGAT	GATGATTGGC	GTAACTGTTG	9780
CAGTGTTATG	TGCCTGTAAA	GCGCGCCGTG	AGTGCCTGAC	GCCATACGCC	CTGGCCCCAA	9840
ACGCCGTAAT	CCCAACTTCG	CTGGCACTCT	TGTGCTGCGT	TAGGTCGGCC	AATGCTGAAA	9900
CGTTCACCGA	GACCATGAGT	TACTTGTGGT	CGAACAGTCA	GCCGTTCTTC	TGGGTCAGT	9960
TGTGCATACC	TTTGGCCGCG	TTATCGTTTC	TAATGCGCTA	CTGCTCCTGC	TGCCTGCCTT	10020
TTTTAGTGGT	TGCCGGCGCC	TACCTGGCGA	AGGTAGACGC	CTACGAACAT	GCGACCACTG	10080
TTCCAAATGT	GCCACAGATA	CCGTATAAGG	CACTTGTTGA	AAGGGCAGGG	TATGCCCGCG	10140
TCAATTTGGA	GATCACTGTC	ATGTCCTCGG	AGGTTTGGCC	TTCCACCAAC	CAAGAGTACA	10200
TTACCTGCAA	ATTCACTACT	GTGGTCCCCT	CCCCAAAAAT	CAAATGCTGC	GGCTCCTTGG	10260
AATGTCAGCC	GGCGGCTCAT	GCAGACTATA	CCTGCAAGGT	CTTCGGAGGG	GTGTACCCCT	10320
TTATGTGGGG	AGGAGCGCAA	TGTTTTTGCG	ACAGTGAGAA	CAGCCAGATG	AGTGAGGCGT	10380
ACGTGCAATT	GTCAGCAGAT	TGCGCGTCTG	ACCAGCGCGA	GGCGATTAAG	GTGCACACTG	10440
CCGCGATGAA	AGTAGGACTG	CGTATAGTGT	ACGGGAAGAC	TACCAGTTTC	CTAGATGTGT	10500
ACGTGAACGG	AGTCACACCA	GGAACGTCTA	AAGACTTGAA	AGTCATAGCT	GGACCAATTT	10560
CAGCATCGTT	TACGCCATTG	GATCATAAGG	TGGTTATCCA	TCGCGGCCGT	GTGTACAACT	10620
ATGACTTCCC	GGAATATGGA	GCGATGAAAC	CAGGAGCGTT	CGGAGACATT	CAAGCTACCT	10680
CCTTGACTAG	CAAGGATCTC	ATCGCCAGCA	CAGACATTAG	GCTACTCAAG	CCTTCCGCCA	10740
AGAACGTGCA	TGTCCCGTAC	ACGCAGGCCG	CATCAGGATT	TGAGATGTGG	AAAAACAAC	10800
CAGGCCGCCC	ACTGCAGGAA	ACCGCACCTT	TCGGGTGTAA	GATTGCAGTA	AATCCGCTCC	10860
GAGCGGTGGA	CTGTTCATAC	GGGAACATTG	CCATTTCTAT	TGACATCCCG	AACGCTGCCT	10920
TTATCAGGAC	ATCAGATGCA	CCACTGGTCT	CAACAGTCAA	ATGTGAAGTC	AGTGAGTGCA	10980
CTTATTCAGC	AGACTTCGGC	GGGATGGCCA	CCCTGCAGTA	TGTATCCGAC	CGCGAAGGTC	11040
AATGCCCCGT	ACATTTCGAT	TCGAGCACAG	CAACTCTCCA	AGAGTCGACA	GTACATGTCC	11100
TGGAGAAAGG	AGCGGTGACA	GTACACTTTA	GCACCGCGAG	TCCACAGGCG	AACCTTTATCG	11160
TATCGCTGTG	TGGGAAGAAAG	ACAACATGCA	ATGCAGAAATG	TAAACCACCA	GCTGACCATA	11220
TCGTGAGCAC	CCCGCACAAA	AATGACCAAG	AATTTCAAGC	CGCCATCTCA	AAAACATCAT	11280
GGAGTTGGCT	GTTTGCCCTT	TTGCGCGGCG	CCTCGTCGCT	ATTAATTATA	GGACTTATGA	11340
TTTTTGCTTG	CAGCATGATG	CTGACTAGCA	CACGAAGATG	ACCGCTACGC	CCCAATGATC	11400

【图3】

## FIGURE 3 F

CGACCAGCAA AACTCGATGT ACTTCCGAGG AACTGATGTG CATAATGCAT CAGGCTGGTA 11460  
 CATTAGATCC CCGCTTACCG CGGGCAATAT AGCAACACTA AAAACTCGAT GTACTTCCGA 11520  
 GGAAGCGCAG TGCATAATGC TGCGCAGTGT TGCCACATAA CCACTATATT AACCATTTAT 11580  
 CTAGCGGACG CCAAAAATC AATGTATTTT TGAGGAAGCG TGGTGCATAA TGCCACGCAG 11640  
 CGTCTGCATA ACTTTTATTA TTCTTTTAT TAATCAACAA AATTTTGT TTAAACATTTT 11700  
 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAATCTAG AGGGCCCTAT TCTATAGTGT CACCTAAATG 11760  
 CTAGAGCTCG CTGATCAGCC TCGACTGTGC CTTCTAGTTG CCAGCCATCT GTTGTGTTGCC 11820  
 CCTCCCCCGT GCTTCCCTTG ACCCTGGAAG GTGCCACTCC CACTGTCCTT TCCTAATAAA 11880  
 ATGAGGAAAT TGATCGCAT TGTCTGAGTA GGTGTCATTG TATTCTGGGG GGTGGGGTGG 11940  
 GGCAGGACAG CAAGGGGGAG GATTGGGAAG ACAATAGCAG GCATGCTGGG GATGCGGTGG 12000  
 GCTCTATGGC TTCTGAGGCG GAAAGAACCA GCTGGGGCTC TAGGGGGTAT CCCCACGCGC 12060  
 CCTGTAGCGG CGCATTAAGC GCGGGGGGTG TGGTGTTAC GCGCAGCGTG ACCGCTACAC 12120  
 TTGCCAGCGC CCTAGCGCCG GCTCCTTTTG CTTTCTTCCC TTCTTTTCTC GCCACGTTG 12180  
 CCGGCTTTCC CGTCAAGCT CTAAATCGGG GCATCCCTTT AGGGTTCCGA TTTAGTGCTT 12240  
 TACGGCACCT CGACCCCAA AAACCTGATT AGGGTGATGG TTCACGTAGT GGGCCATCGC 12300  
 CCTGATAGAG GGTTTTTCGC CTTTGACGT TGGAGTCCAC GTTCTTTAAT AGTGGACTCT 12360  
 TGTTCCAAAC TGAACAACA CTCAACCCTA TCTCGGTCTA TTCTTTGAT TTATAAGGGA 12420  
 TTTTGGGGAT TTGGGCTAT TGGTTAAAAA ATGAGCTGAT TTAACAAAAA TTTAACGCGA 12480  
 ATTAATTCTG TGAATGTGT GTCAGTTAGG GTGTGGAAG TCCCAGGCT CCCCAGGCAG 12540  
 GCAGAAGTAT GCAAAGCATG CATCTCAATT AGTCAGCAAC CAGGTGTGGA AAGTCCCCAG 12600  
 GCTCCCCAGC AGGCAGAAGT ATGCAAAGCA TGCATCTCAA TTAGTCAGCA ACCATAGTCC 12660  
 CGCCCCTAAC TCCGCCATC CCGCCCCAA CTCCGCCAG TTCCGCCAT TCTCCGCCCC 12720  
 ATGGCTGACT AATTTTTTTT ATTTATGCAG AGGCCGAGGC CCGCTCTGCC TCTGAGCTAT 12780  
 TCCAGAAGTA GTGAGGAGGC TTTTGTGGAG GCTAGGCTT TTGCAAAAAG CTCCCGGGAG 12840  
 CTTGTATATC CATTTTGGGA TCTGATCAAG AGACAGGATG AGGATCGTTT CGCATGATTG 12900  
 AACAAGATGG ATTGCACGCA GGTCTCCGG CCGCTTGGGT GGAGAGGCTA TTCGGCTATG 12960  
 ACTGGGCACA AGAGACAATC GGCTGCTGTG ATGCCGCCGT GTTCCGGCTG TCAGCGCAGG 13020  
 GGCGCCCGGT TCTTTTTGTC AAGACCGACC TGTCCGGTGC CCTGAATGAA CTGCAGGACG 13080  
 AGGCAGCGCG GCTATCGTGG CTGGCCACGA CCGGCGTTCC TTGCGCAGCT GTGCTCGACG 13140  
 TTGTCACTGA AGCGGGAAGG GACTGGCTGC TATTGGGCGA AGTGCCGGGG CAGGATCTCC 13200  
 TGTCATCTCA CTTGCTCCT GCCGAGAAAG TATCATCAT GGCTGATGCA ATGCGGGGGC 13260  
 TGCATACGCT TGATCCGGCT ACCTGCCAT TCGACCACCA AGCGAAACAT CGCATCGAGC 13320  
 GAGCACGTAC TCGGATGGAA GCCGGTCTTG TCGATCAGGA TGATCTGGAC GAAGAGCATC 13380  
 AGGGGCTCGC GCCAGCCGAA CTGTTCCGCA GGCTCAAGGC GCGCATGCC GACGGCGAGG 13440  
 ATCTCGTCGT GACCCATGGC GATGCCTGCT TGCCGAATAT CATGGTGGAA AATGGCCGCT 13500  
 TTTCTGGATT CATCGACTGT GGCCGGCTGG GTGTGGCGGA CCGCTATCAG GACATAGCGT 13560  
 TGGCTACCCG TGATATTGCT GAAGAGCTTG GCGGCGAATG GGCTGACCGC TTCCTCGTGC 13620  
 TTTACGGTAT CGCCGCTCCC GATTCGCAGC GCATCGCCTT CTATCGCCTT CTTGACGAGT 13680

【图3】

## FIGURE 3 G

TCTTCTGAGC	GGGACTCTGG	GGTTCGAAAT	GACCGACCAA	GCGACGCCCA	ACCTGCCATC	13740
ACGAGATTTC	GATTCCACCG	CCGCTTCTA	TGAAAGGTTG	GGCTTCGGAA	TCGTTTTCCG	13800
GGACGCCGGC	TGGATGATCC	TCCAGCGCGG	GGATCTCATG	CTGGAGTTCT	TCGCCACCC	13860
CAACTTGTTT	ATTGCAGCTT	ATAATGGTTA	CAAATAAAGC	AATAGCATCA	CAAATTTAC	13920
AAATAAAGCA	TTTTTTTTCAC	TGCATTCTAG	TTGTGGTTTG	TCCAAACTCA	TCAATGTATC	13980
TTATCATGTC	TGTATACCGT	CGACCTCTAG	CTAGAGCTTG	GCGTAATCAT	GGTCATAGCT	14040
GTTTCCTGTG	TGAAATTGTT	ATCCGCTCAC	AATTCCACAC	AACATACGAG	CCGGAAGCAT	14100
AAAGTGATAA	GCCTGGGGTG	CCTAATGAGT	GAGCTAACTC	ACATTAATTG	CGTTGCGCTC	14160
ACTGCCCGCT	TTCAGTCCG	GAAACGTGTC	GTGCCAGCTG	CATTAATGAA	TCGGCCAACG	14220
CGCGGGGAGA	GGCGGTTTGC	GTATTGGGCG	CTCTTCGGCT	TCCTCGCTCA	CTGACTCGCT	14280
GCGCTCGGTC	GTTCCGGCTGC	GGCGAGCGGT	ATCAGCTCAC	TCAAAGGCGG	TAATACGGTT	14340
ATCCACAGAA	TCAGGGGATA	ACGCAGGAAA	GAACATGTGA	GCAAAAGGCC	AGCAAAAGGC	14400
CAGGAACCGT	AAAAAGGCCG	CGTTGCTGGC	GTTTTTCCAT	AGGCTCGGCG	CCCCTGACGA	14460
GCATCACAAA	AATCGACGCT	CAAGTCAGAG	GTGGCGAAAC	CCGACAGGAG	TATAAAGATA	14520
CCAGGCGTTT	CCCCCTGGAA	GCTCCCTCGT	GCGETCTCCT	GTTCCGACCC	TGCCGCTTAC	14580
CGGATACCTG	TCCGCCTTTC	TCCCTTGGGG	AAGCGTGGCG	CTTCTCAAT	GCTCAGCGTG	14640
TAGGTATCTC	AGTTCGGTGT	AGGTCGTTCT	CTCCAAGCTG	GGCTGTGTGC	ACGAACCCCC	14700
CGTTCAGCCC	GACCGCTGCG	CCTTATCCGG	TAATATCGT	CTTGAGTCCA	ACCCGGTAAG	14760
ACACGACTTA	TCGCCACTGG	CAGCAGCCAC	TGGTAACAGG	ATTAGCAGAG	CGAGGTATGT	14820
AGGCGGTGCT	ACAGAGTTCT	TGAAGTGGTG	GCCTAACTAC	GGCTACACTA	GAAGGACAGT	14880
ATTTGGTATC	TGCGCTCTGC	TGAAGCCAGT	TACCTTCGGA	AAAAGAGTTG	GTAGCTCTTG	14940
ATCCGGCAAA	CAAAACCACG	CTGGTAGCGG	TGGTTTTTTT	GTTTGCAAGC	AGCAGATTAC	15000
GCGCAGAAAA	AAAGGATCTC	AAGAAGATCC	TTTGATCTTT	TCTACGGGGT	CTGACGCTCA	15060
GTGGAACGAA	AAGTCACGTT	AAGGBATTTT	GGTCATGAGA	TTATCAAAAA	GGATCTTCAC	15120
CTAGATCCTT	TAAATTAATA	AATGAAGTTT	TAAATCAATC	TAAAGTATAT	ATGAGTAAAC	15180
TTGGTCTGAC	AGTTACCAAT	GCTTAATCAG	TGAGGCACCT	ATCTCAGCGA	TCTGTCTATT	15240
TCGTTTCATC	ATAGTTGCCT	GACTCCCGCT	CGTGTAGATA	ACTACGATAC	GGGAGGGCTT	15300
ACCATCTGGC	CCCAAGTCTG	CAATGATACC	GCGAGACCCA	CGCTCACCAG	CTCCAGATTT	15360
ATCAGCAATA	AACCAGCCAG	CCGGAAGGGC	CGAGCGCAGA	AGTGGTCCTG	CAACTTTATC	15420
CGCCTCCATC	CAGTCTATTA	ATTGTTGCCG	GGAAGCTAGA	GTAAGTAGTT	CGCCAGTTAA	15480
TAGTTTGCGC	AACGTTGTTG	CCATTGCTAC	AGGCATCGTG	GTGTCACGCT	CGTCGTTTGG	15540
TATGGCTTCA	TTCAGCTCCG	GTTCCCAACG	ATCAAGGCCA	GTTACATGAT	CCCCCATGTT	15600
GTGCAAAAAA	GCGGTTAGCT	CCTTCGGTCC	TCCGATCGTT	GTGAGAAGTA	AGTTGGCCGC	15660
AGTGTTATCA	CTCATGGTTA	TGGCAGCACT	GCATAATTCT	CTTACTGTCA	TGCCATCCGT	15720
AAGATGCTTT	TCTGTGACTG	GTGAGTACTC	AACCAAGTCA	TTCTGAGAAT	AGTGATGCG	15780
GCGACCGAGT	TGCTCTTGCC	CGGCGTCAAT	ACGGGATAAT	ACCGCGCCAC	ATAGCAGAAC	15840
TTTAAAAGTG	CTCATCATTG	GAAAACGTTT	TTCGGGGCGA	AAACTCTCAA	GGATCTTACC	15900
GCTGTTGAGA	TCCAGTTCGA	TGTAACCCAC	TCGTGCACCC	AACTGATCTT	CAGCATCTTT	15960



【图3】

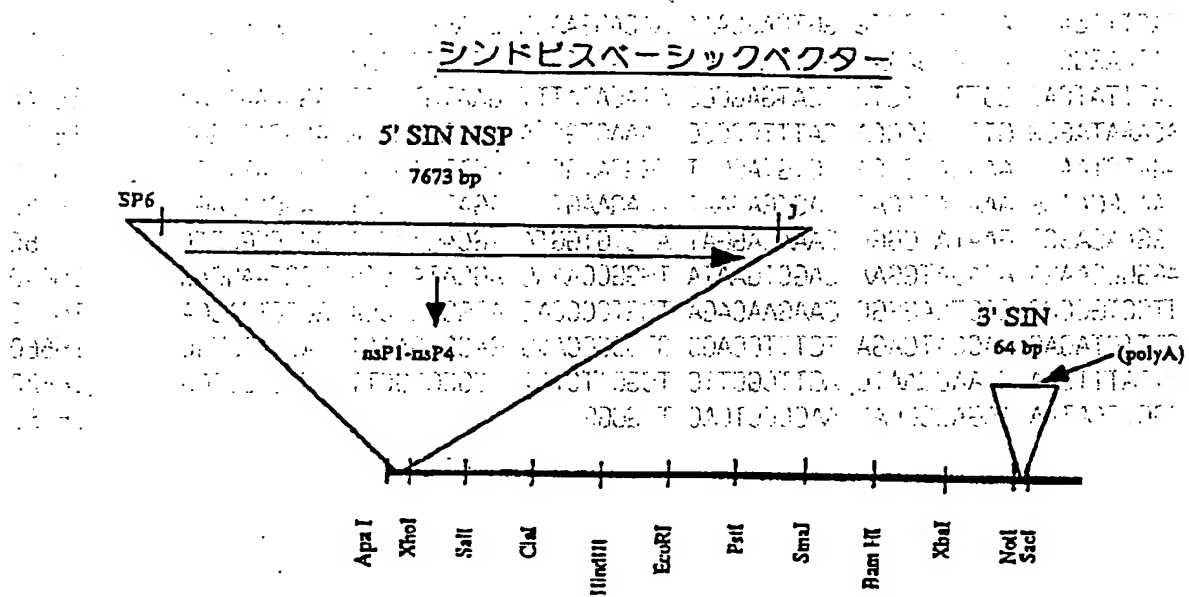
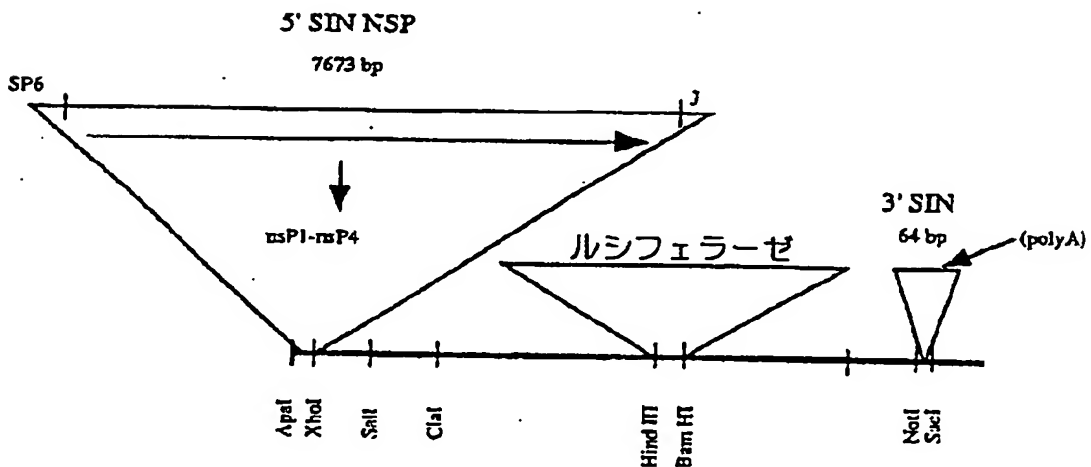
## FIGURE 3 H

TACTTTCACC AGCGTTTCTG GGTGAGCAAA AACAGGAAGG CAAAATGCCG CAAAAAGGG	16020
AATAAGGGCG ACACGGAAAT GTTGAATACT CATACTCTC CTTTTCAAT ATTATTGAAG	16080
CATTTATCAG GGTATTGTC TCATGAGCGG ATACATATTT GAATGTATTT AGAAAAATAA	16140
ACAAATAGGG GTTCCGCGCA CATTTCCTCG AAAAGTGCCA CCTGACGTCG ACGGATCGGG	16200
AGATCTAATG AAAGACCCCA CCTGTAGGTT TGGCAAGCTA GCTTAAGTAA CGCCATTTTG	16260
CAAGGCATGG AAAAATACAT AACTGAGAAT AGAGAAGTTC AGATCAAGGT CAGGAACAGA	16320
TGGAACAGCT GAATATGGGC CAAACAGGAT ATCTGTGGTA AGCAGTTCCT GCCCCGGCTC	16380
AGGGCCAAGA ACAGATGGAA CAGCTGAATA TGGSCCAAAC AGGATATCTG TGGTAAGCAG	16440
TTCCTGCCCG GGCTCAGGGC CAAGAACAGA TGGTCCCCAG ATGCGGTCCA GCCCTCAGCA	16500
GTTTCTAGAG AACCATCAGA TGTTTCCAGG GTGCCCAAG GACCTGAAAT GACCCTGTGC	16560
CTTATTTGAA CTAACCAATC AGTTCGCTT TCGCTTCTGT TCGCGCGCTT CTGCTCCCCG	16620
AGCTCAATAA AAGAGCCAC AACCCCTCAC TCGGGG	16656

【図4】

FIGURE 4

## シンドピスの発現ベクター

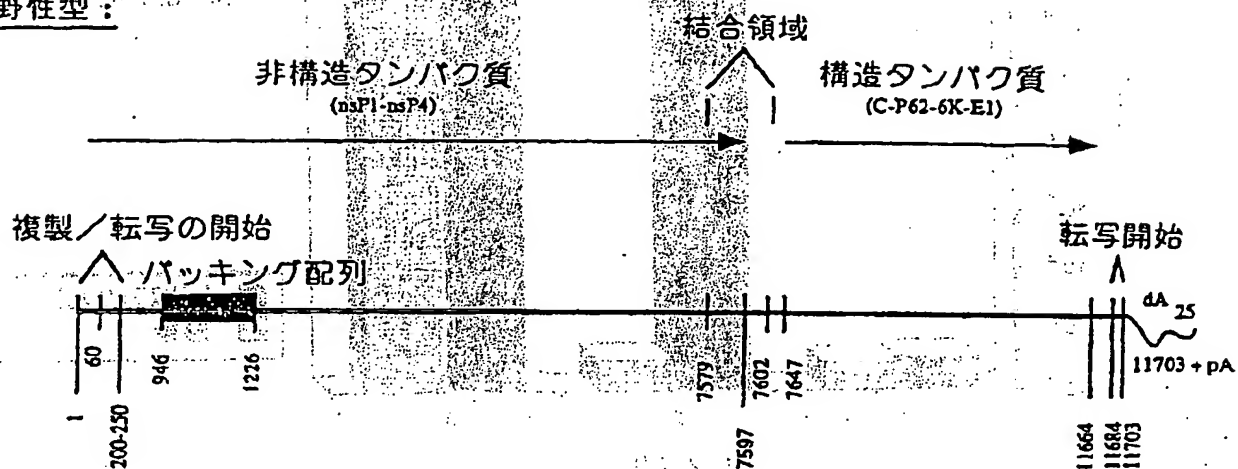
シンドピスールシフェラーゼ

【図5】

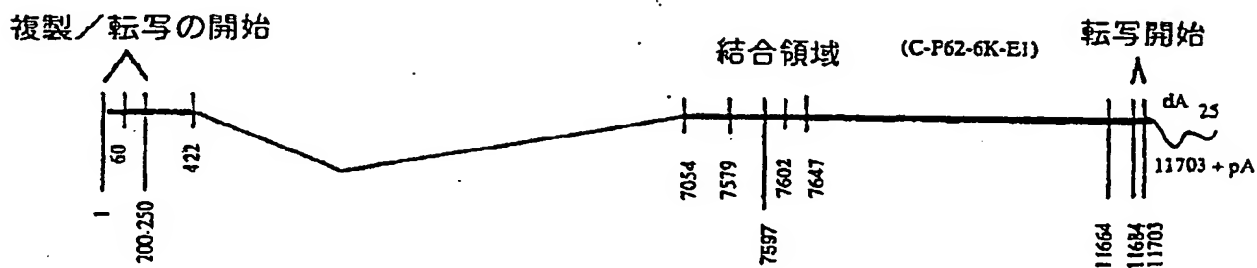
FIGURE 5

## シンドビスヘルパーベクターの構成

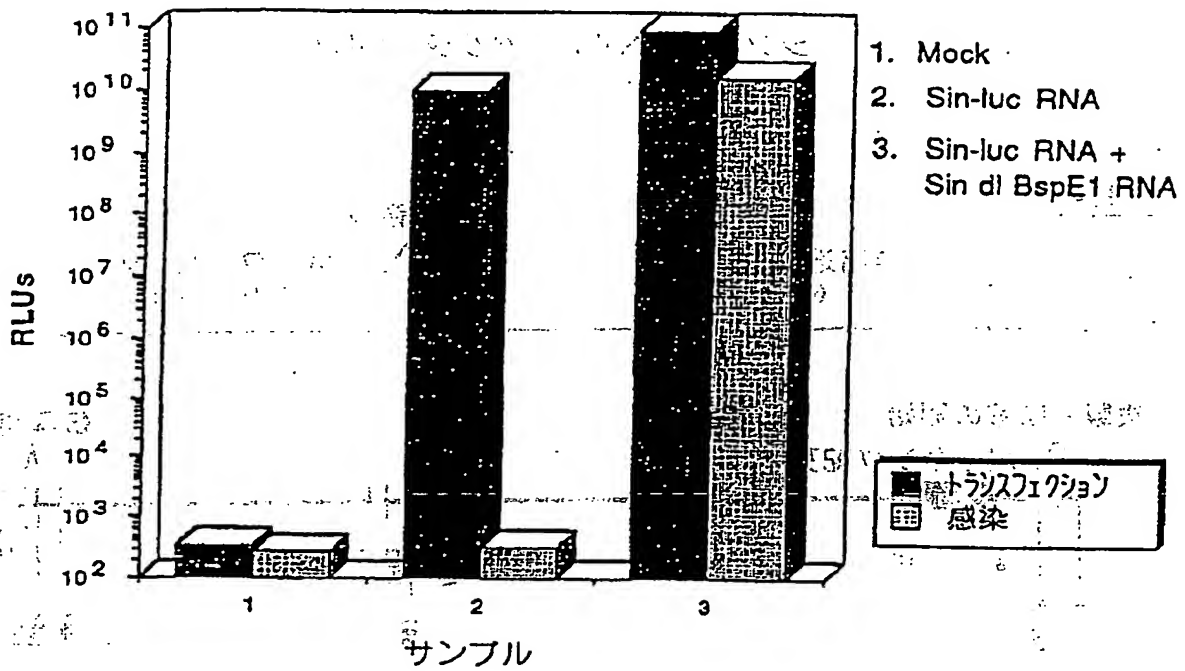
野性型:



dl Bsp EI:



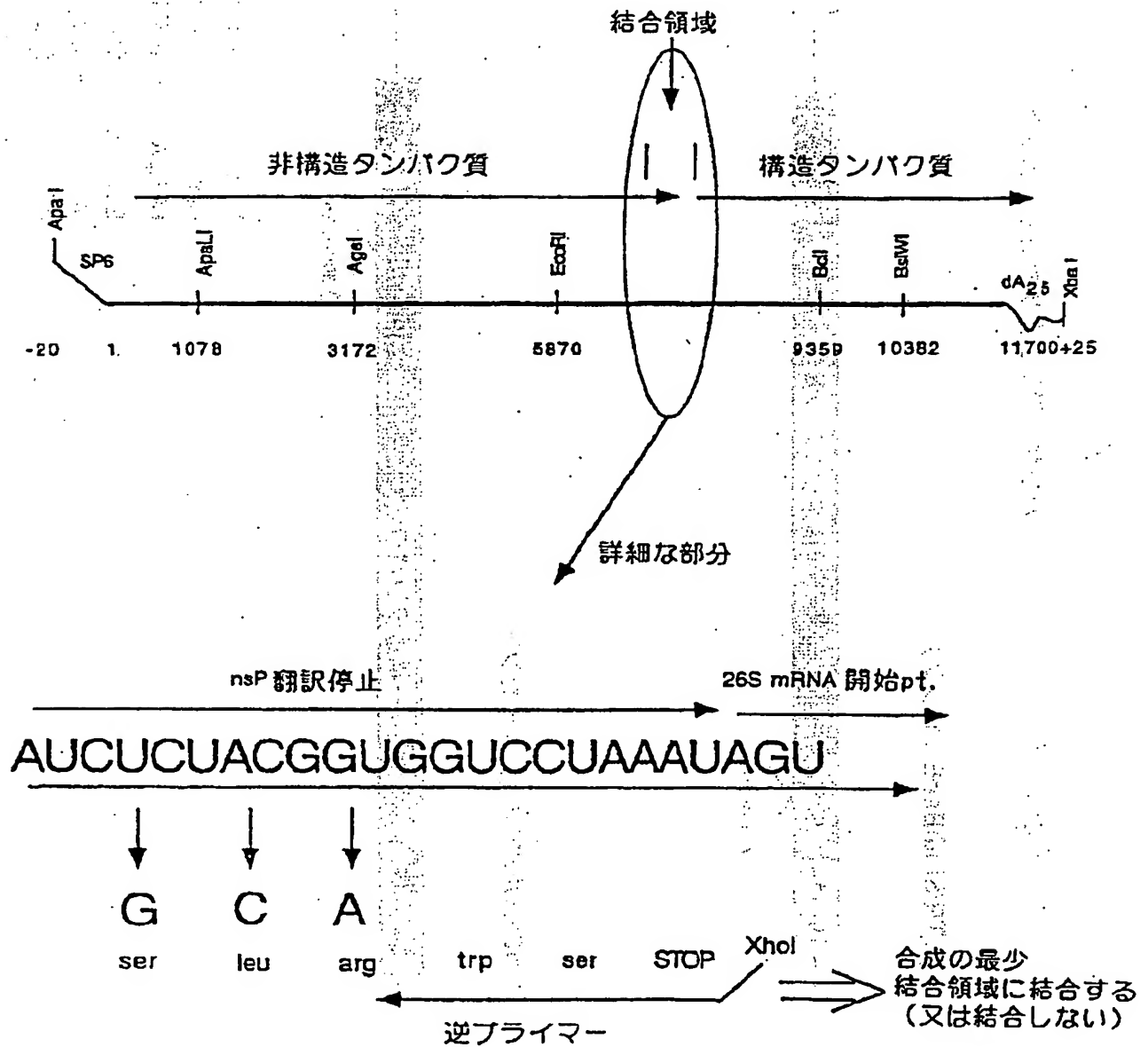
【図6】

Figure 6: シンドビスールシフェラーゼベクタの  
発現及びレスキュー

【図7】

FIGURE 7

## シンドピス結合領域の修飾



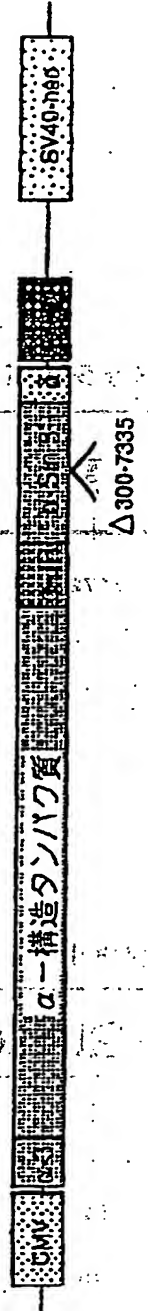
【図8】

Figure 8  
パッケージング発現カセットのスケム

pLTR/SindlBspe (センス)



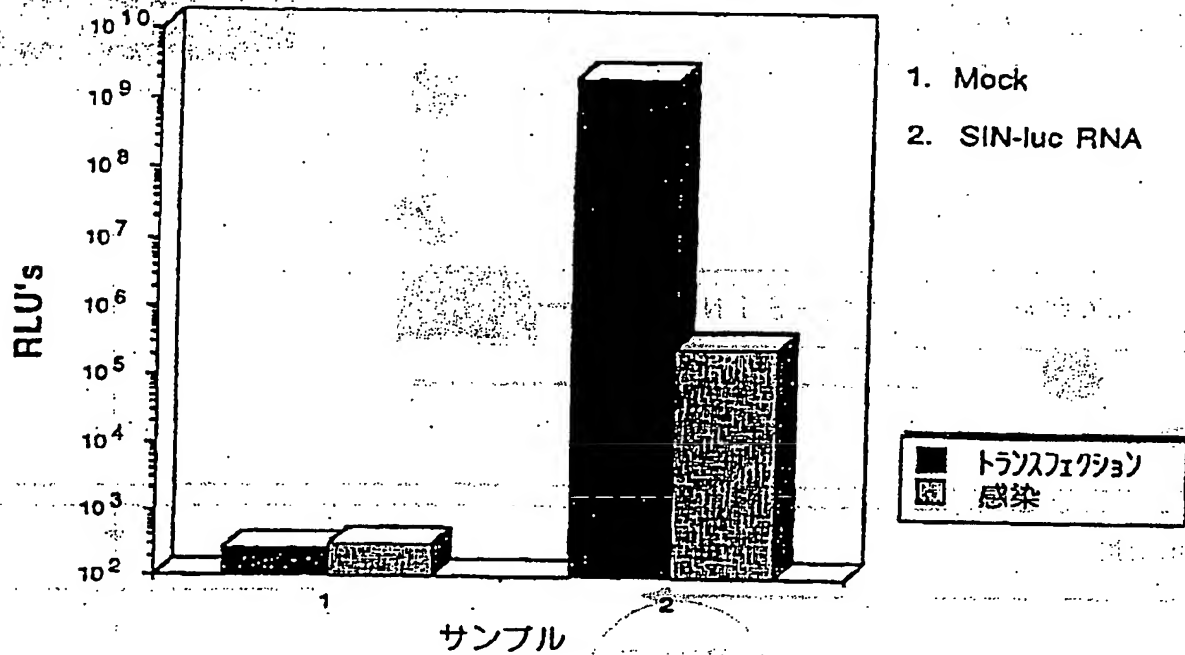
pCMV/δ5'26S (アンチセンス)



- |          |   |                      |
|----------|---|----------------------|
| Mo-LTR   | — | Moloney MuLV LTR     |
| CMV      | — | サイトメガウイルスIEプロモーター-9- |
| BGHpA    | — | 転写終結/ポリAシグナル         |
| SV40-neo | — | 耐ネオミシン               |
| δ        | — | HDV アンチゲル リンゲル       |
| JR       | — | 結合領域                 |

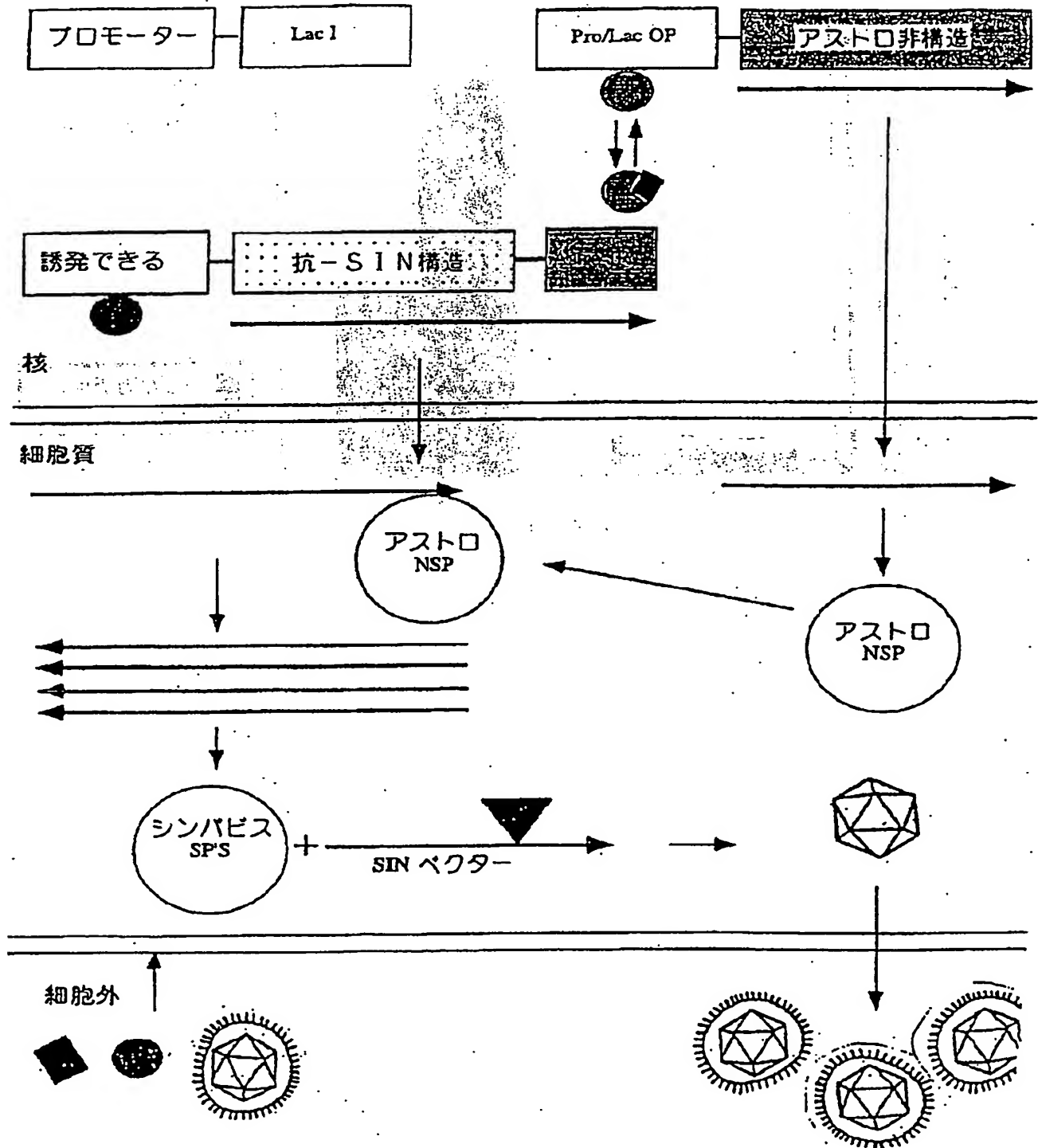
【図9】

Figure 9: LTR/SinI BspE細胞におけるシンドビス-  
ルシフェラーゼベクターパッケージング



【図10】

FIGURE 10

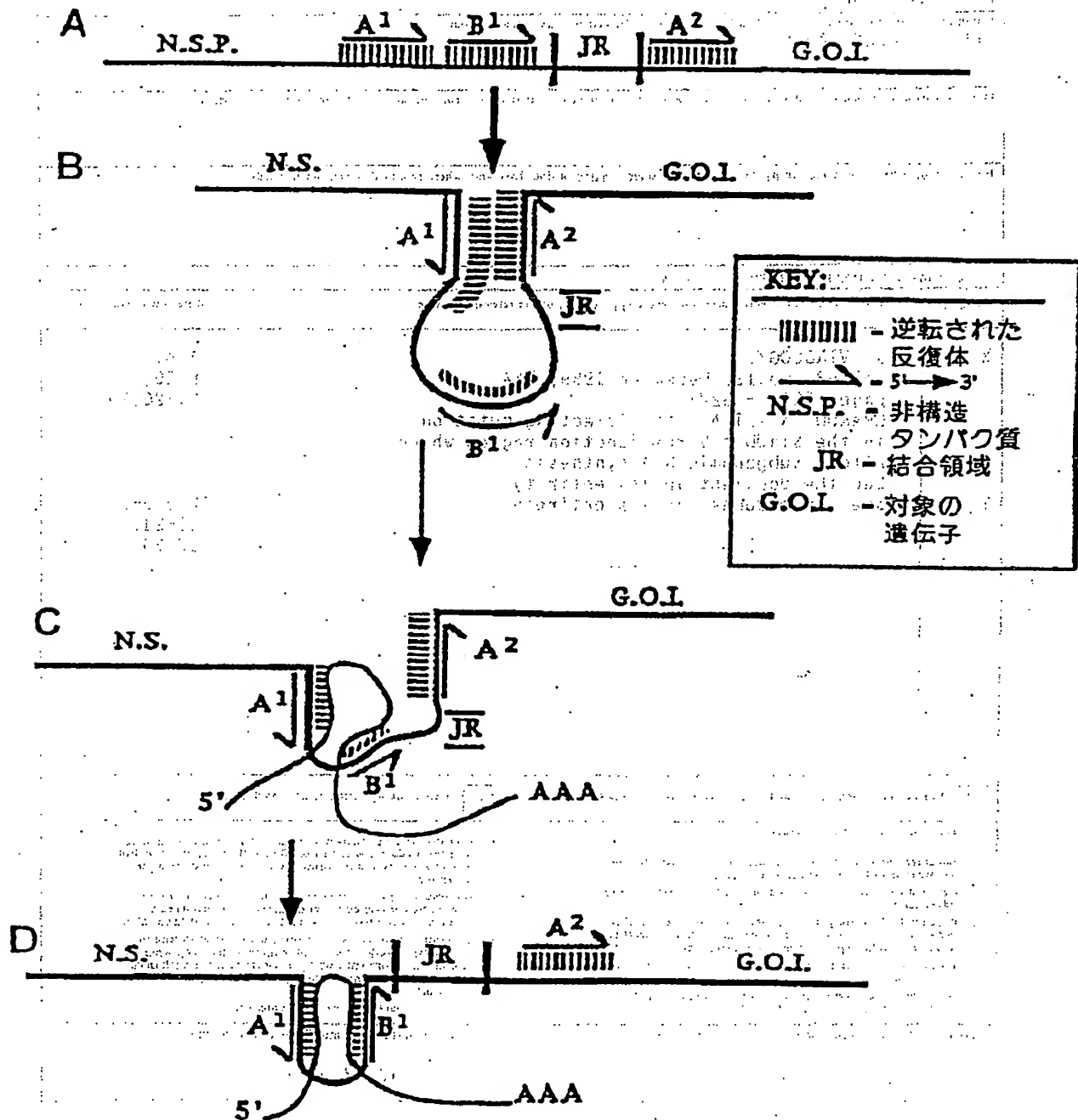




【図11】

FIGURE 11

無力化された結合領域のループアウト



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/86 A61K35/76 A61K39/12		International Application No. PCT/US 94/10469
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation in the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J. VIROLOGY, vol. 63, no. 12, December 1989, USA pages 5216 - 5227 GRAKOU, A. ET AL. 'A cis-acting mutation in the Sindbis Virus junction region which affect subgenomic RNA synthesis' See the document in its entirety	1, 4, 8-10, 21-26, 29
Y	See the document in its entirety	2, 3, 5-7, 11-21, 27-30
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 March 1995		Date of mailing of the international search report 17.07.95
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HH Rijswijk Td. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Germinario C.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/US 84/10469

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J. VIROLOGY, vol.65, no.5, May 1991, USA pages 2501 - 2510 RAJU R. ET AL. 'Analysis of Sindbis Virus promoter recognition in vivo using novel vectors with two subgenomic mRNA promoters' See the document in its entirety	2-6, 8-10, 21-24, 26,30
Y	See document in its entirety	1,7,8, 11-20, 25,27-29
Y	J. VIROLOGY, vol.66, no.2, February 1992, USA pages 857 - 864 HERZT. J. M. ET AL 'Utilisation of heterologous alphavirus junction sequences as promoter by Sindbis virus' See Results and Material and Methods	1-30
Y	WO,A,92 10578 (BIOPTION) 25 June 1992 See page 3-13, examples 2-4, claims 12 to 41	1-30
Y	SCIENCE, vol.243, 3 March 1989, WASHINGTON pages 1188 - 1191 CHENG XIONG ET AL. 'Sindbis virus: an efficient broad host range vector for gene expression in animal cells' See the document in its entirety	1-30
Y	US,A,5 091 309 (WASHINGTON UNIVERSITY) 25 February 1992 cited in the application See Summary and example 2	1-30

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US94/10469

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6A(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

please see enclosure../..!

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-6, 29, 30 and dependent claims (i.e. 1-30)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/210

LACK OF UNITY OF INVENTION

1. Claims: 1-6, 29, 30 and claims dependent (i.e. 1-30)
2. Claims: 31, 34 and claims dependent
3. Claims: 37, 38, 40, 44, 56, 57, 63, 72, 75-79, 84 and claims dependent
4. Claims: 85, 86 and claims dependent

The present application comprises 28 independent claims which identify four independent inventions.

The subject matter of the first invention is represented by the alpha-virus vector of claims 1 to 6, 29, 30, and claims dependent thereon. The vector is characterized by the feature of comprising a modified or inactivated viral junction region, which implies the prevention of the transcription of the subgenomic fragment and therefore the defective or blocked expression of the alpha virus structural proteins.

The subject matter of the second invention is the expression cassette of claims 31 and 34 and claims dependent thereon. The cassette comprises a promoter which directs the expression of alpha virus structural proteins. This second invention is not directed to an alpha virus vector and does not comprise the characterizing feature of the previous invention, namely a modified junction region. Should in any case this region be present in the cassette, it would be fully functional (contrary to the first invention) to allow the expression of the viral structural protein.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/210

The subject matter of the third invention is represented by the alpha virus particles and cells infected by said particles of claims 37, 38, 40, 44, 56, 57, 63, 72, 75-79, 84 and claims dependent thereon.

The lack of unity of this invention versus the alpha vector of the first invention derives from the fact the alpha vector is not necessarily packaged into a viral particle of the third invention.

Moreover the viral particles do not comprise an inactivated or modified junction region, which is the characterizing feature of the first invention.

The fourth invention is the layered vector initiation system of claims 85, 86 and claims dependent thereon, which is in no way limited to alpha virus.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Patent Application No.

PCT/US 94/10469

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9210578	25-06-92	AU-B- 656545	09-02-95
		AU-A- 9078791	08-07-92
		EP-A- 0561890	29-09-93
		JP-T- 6504198	19-05-94
<hr/>			
US-A-5091309	25-02-92	NONE	
<hr/>			

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	
C 0 7 H 21/04		9637-4B	C 1 2 P 21/02	C
C 0 7 K 14/18		9281-4B	C 1 2 N 5/00	B
C 1 2 N 5/10		9051-4C	A 6 1 K 37/04	ABA
7/00		9051-4C	37/54	ADY
C 1 2 P 21/02		9051-4C		ADU

//(C 1 2 P 21/02  
C 1 2 R 1:91)

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, MW, SD), AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, FI, G E, HU, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LT, MG, MN, MW, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SI, SK, TJ, TT, UA, UZ, V N

(72)発明者 イバネス, カルロス イー.  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 92129,  
サンディエゴ, ミルボンド ウェイ  
13592

(72)発明者 チャン, スティーブン エム. ダブリュ.  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 92129,  
サンディエゴ, ビア カカレス 9838

(72)発明者 ジョリー, ダグラス ジェイ.  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 92024,  
ルーカディア, ヒルクレスト ドライブ  
277

(72)発明者 ドライバー, デビッド エー.  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 92117,  
サンディエゴ, ビルトモア ストリート  
5142

(72)発明者 ボロ, ジョン エム.  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 92109,  
サンディエゴ, ナンバー フォー, リード  
アベニュー 1222



【公報種別】特許法第 17 条第 1 項及び特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成 14 年 2 月 19 日 (2002. 2. 19)

【公表番号】特表平 9-503657

【公表日】平成 9 年 4 月 15 日 (1997. 4. 15)

【年通号数】

【出願番号】特願平 7-509370

【国際特許分類第 7 版】

C12N 15/09 ZNA

A61K 38/16 ABA

38/46 ADU

ADY

48/00 AED

C07H 21/04

C07K 14/18

C12N 5/10

7/00

C12P 21/02

//(C12P 21/02

C12R 1:91 )

【F I】

C12N 15/00 ZNA A

A61K 48/00 AED

C07H 21/04 B

C07K 14/18

C12N 7/00

C12P 21/02 C

C12N 5/00 B

A61K 37/04 ABA

37/54 ADY

ADU

## 手続前正書

平成13年6月28日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

平成7年特許第509370号

2. 補正をする者

住所 アメリカ合衆国、カリフォルニア 94608, エミリービル,  
ホートン ストリート 4560

名称 カイハン コーポレーション

3. 代理人

住所 〒540-8016 大阪府大阪市中央区城見一丁目2番27号

クリスタルタワー16階

氏名 (7829) 弁護士 山本 秀雄

電話 (大阪) 06-5561-3910

4. 補正対象書類名

請求の範囲

5. 補正対象項目名

請求の範囲

6. 補正の内容

請求の範囲を下記の通り補正します。

チウイルス及びプロモウイルスから成るグループの中から選択されたウイルスから誘導される、異核相重層ベクター・イニシエーション系。

7. 請求の範囲第1項に記載の異核相重層ベクター・イニシエーション系であって、ここで、前記プロモーターが、MCMVプロモーター、メタコチオネインプロモーター、グルココルチコイドプロモーター、SV40プロモーター、EBV 35Sプロモーター、ノバリンシテターゼプロモーター及びRVプロモーターから成るグループの中から選択される、異核相重層ベクター・イニシエーション系。

8. 請求の範囲第1項に記載の異核相重層ベクター・イニシエーション系であって、ここで前記異核相重層が、11-1、11-2、11-3、11-4、11-5、11-6、11-7、11-8、11-9、11-10、11-11、11-12、11-13、11-14、11-15、11-16、11-17、11-18、11-19、11-20、11-21、11-22、11-23、11-24、11-25、11-26、11-27、11-28、11-29、11-30、11-31、11-32、11-33、11-34、11-35、11-36、11-37、11-38、11-39、11-40、11-41、11-42、11-43、11-44、11-45、11-46、11-47、11-48、11-49、11-50、11-51、11-52、11-53、11-54、11-55、11-56、11-57、11-58、11-59、11-60、11-61、11-62、11-63、11-64、11-65、11-66、11-67、11-68、11-69、11-70、11-71、11-72、11-73、11-74、11-75、11-76、11-77、11-78、11-79、11-80、11-81、11-82、11-83、11-84、11-85、11-86、11-87、11-88、11-89、11-90、11-91、11-92、11-93、11-94、11-95、11-96、11-97、11-98、11-99、11-100、11-101、11-102、11-103、11-104、11-105、11-106、11-107、11-108、11-109、11-110、11-111、11-112、11-113、11-114、11-115、11-116、11-117、11-118、11-119、11-120、11-121、11-122、11-123、11-124、11-125、11-126、11-127、11-128、11-129、11-130、11-131、11-132、11-133、11-134、11-135、11-136、11-137、11-138、11-139、11-140、11-141、11-142、11-143、11-144、11-145、11-146、11-147、11-148、11-149、11-150、11-151、11-152、11-153、11-154、11-155、11-156、11-157、11-158、11-159、11-160、11-161、11-162、11-163、11-164、11-165、11-166、11-167、11-168、11-169、11-170、11-171、11-172、11-173、11-174、11-175、11-176、11-177、11-178、11-179、11-180、11-181、11-182、11-183、11-184、11-185、11-186、11-187、11-188、11-189、11-190、11-191、11-192、11-193、11-194、11-195、11-196、11-197、11-198、11-199、11-200、11-201、11-202、11-203、11-204、11-205、11-206、11-207、11-208、11-209、11-210、11-211、11-212、11-213、11-214、11-215、11-216、11-217、11-218、11-219、11-220、11-221、11-222、11-223、11-224、11-225、11-226、11-227、11-228、11-229、11-230、11-231、11-232、11-233、11-234、11-235、11-236、11-237、11-238、11-239、11-240、11-241、11-242、11-243、11-244、11-245、11-246、11-247、11-248、11-249、11-250、11-251、11-252、11-253、11-254、11-255、11-256、11-257、11-258、11-259、11-260、11-261、11-262、11-263、11-264、11-265、11-266、11-267、11-268、11-269、11-270、11-271、11-272、11-273、11-274、11-275、11-276、11-277、11-278、11-279、11-280、11-281、11-282、11-283、11-284、11-285、11-286、11-287、11-288、11-289、11-290、11-291、11-292、11-293、11-294、11-295、11-296、11-297、11-298、11-299、11-300、11-301、11-302、11-303、11-304、11-305、11-306、11-307、11-308、11-309、11-310、11-311、11-312、11-313、11-314、11-315、11-316、11-317、11-318、11-319、11-320、11-321、11-322、11-323、11-324、11-325、11-326、11-327、11-328、11-329、11-330、11-331、11-332、11-333、11-334、11-335、11-336、11-337、11-338、11-339、11-340、11-341、11-342、11-343、11-344、11-345、11-346、11-347、11-348、11-349、11-350、11-351、11-352、11-353、11-354、11-355、11-356、11-357、11-358、11-359、11-360、11-361、11-362、11-363、11-364、11-365、11-366、11-367、11-368、11-369、11-370、11-371、11-372、11-373、11-374、11-375、11-376、11-377、11-378、11-379、11-380、11-381、11-382、11-383、11-384、11-385、11-386、11-387、11-388、11-389、11-390、11-391、11-392、11-393、11-394、11-395、11-396、11-397、11-398、11-399、11-400、11-401、11-402、11-403、11-404、11-405、11-406、11-407、11-408、11-409、11-410、11-411、11-412、11-413、11-414、11-415、11-416、11-417、11-418、11-419、11-420、11-421、11-422、11-423、11-424、11-425、11-426、11-427、11-428、11-429、11-430、11-431、11-432、11-433、11-434、11-435、11-436、11-437、11-438、11-439、11-440、11-441、11-442、11-443、11-444、11-445、11-446、11-447、11-448、11-449、11-450、11-451、11-452、11-453、11-454、11-455、11-456、11-457、11-458、11-459、11-460、11-461、11-462、11-463、11-464、11-465、11-466、11-467、11-468、11-469、11-470、11-471、11-472、11-473、11-474、11-475、11-476、11-477、11-478、11-479、11-480、11-481、11-482、11-483、11-484、11-485、11-486、11-487、11-488、11-489、11-490、11-491、11-492、11-493、11-494、11-495、11-496、11-497、11-498、11-499、11-500、11-501、11-502、11-503、11-504、11-505、11-506、11-507、11-508、11-509、11-510、11-511、11-512、11-513、11-514、11-515、11-516、11-517、11-518、11-519、11-520、11-521、11-522、11-523、11-524、11-525、11-526、11-527、11-528、11-529、11-530、11-531、11-532、11-533、11-534、11-535、11-536、11-537、11-538、11-539、11-540、11-541、11-542、11-543、11-544、11-545、11-546、11-547、11-548、11-549、11-550、11-551、11-552、11-553、11-554、11-555、11-556、11-557、11-558、11-559、11-560、11-561、11-562、11-563、11-564、11-565、11-566、11-567、11-568、11-569、11-570、11-571、11-572、11-573、11-574、11-575、11-576、11-577、11-578、11-579、11-580、11-581、11-582、11-583、11-584、11-585、11-586、11-587、11-588、11-589、11-590、11-591、11-592、11-593、11-594、11-595、11-596、11-597、11-598、11-599、11-600、11-601、11-602、11-603、11-604、11-605、11-606、11-607、11-608、11-609、11-610、11-611、11-612、11-613、11-614、11-615、11-616、11-617、11-618、11-619、11-620、11-621、11-622、11-623、11-624、11-625、11-626、11-627、11-628、11-629、11-630、11-631、11-632、11-633、11-634、11-635、11-636、11-637、11-638、11-639、11-640、11-641、11-642、11-643、11-644、11-645、11-646、11-647、11-648、11-649、11-650、11-651、11-652、11-653、11-654、11-655、11-656、11-657、11-658、11-659、11-660、11-661、11-662、11-663、11-664、11-665、11-666、11-667、11-668、11-669、11-670、11-671、11-672、11-673、11-674、11-675、11-676、11-677、11-678、11-679、11-680、11-681、11-682、11-683、11-684、11-685、11-686、11-687、11-688、11-689、11-690、11-691、11-692、11-693、11-694、11-695、11-696、11-697、11-698、11-699、11-700、11-701、11-702、11-703、11-704、11-705、11-706、11-707、11-708、11-709、11-710、11-711、11-712、11-713、11-714、11-715、11-716、11-717、11-718、11-719、11-720、11-721、11-722、11-723、11-724、11-725、11-726、11-727、11-728、11-729、11-730、11-731、11-732、11-733、11-734、11-735、11-736、11-737、11-738、11-739、11-740、11-741、11-742、11-743、11-744、11-745、11-746、11-747、11-748、11-749、11-750、11-751、11-752、11-753、11-754、11-755、11-756、11-757、11-758、11-759、11-760、11-761、11-762、11-763、11-764、11-765、11-766、11-767、11-768、11-769、11-770、11-771、11-772、11-773、11-774、11-775、11-776、11-777、11-778、11-779、11-780、11-781、11-782、11-783、11-784、11-785、11-786、11-787、11-788、11-789、11-790、11-791、11-792、11-793、11-794、11-795、11-796、11-797、11-798、11-799、11-800、11-801、11-802、11-803、11-804、11-805、11-806、11-807、11-808、11-809、11-810、11-811、11-812、11-813、11-814、11-815、11-816、11-817、11-818、11-819、11-820、11-821、11-822、11-823、11-824、11-825、11-826、11-827、11-828、11-829、11-830、11-831、11-832、11-833、11-834、11-835、11-836、11-837、11-838、11-839、11-840、11-841、11-842、11-843、11-844、11-845、11-846、11-847、11-848、11-849、11-850、11-851、11-852、11-853、11-854、11-855、11-856、11-857、11-858、11-859、11-860、11-861、11-862、11-863、11-864、11-865、11-866、11-867、11-868、11-869、11-870、11-871、11-872、11-873、11-874、11-875、11-876、11-877、11-878、11-879、11-880、11-881、11-882、11-883、11-884、11-885、11-886、11-887、11-888、11-889、11-890、11-891、11-892、11-893、11-894、11-895、11-896、11-897、11-898、11-899、11-900、11-901、11-902、11-903、11-904、11-905、11-906、11-907、11-908、11-909、11-910、11-911、11-912、11-913、11-914、11-915、11-916、11-917、11-918、11-919、11-920、11-921、11-922、11-923、11-924、11-925、11-926、11-927、11-928、11-929、11-930、11-931、11-932、11-933、11-934、11-935、11-936、11-937、11-938、11-939、11-940、11-941、11-942、11-943、11-944、11-945、11-946、11-947、11-948、11-949、11-950、11-951、11-952、11-953、11-954、11-955、11-956、11-957、11-958、11-959、11-960、11-961、11-962、11-963、11-964、11-965、11-966、11-967、11-968、11-969、11-970、11-971、11-972、11-973、11-974、11-975、11-976、11-977、11-978、11-979、11-980、11-981、11-982、11-983、11-984、11-985、11-986、11-987、11-988、11-989、11-990、11-991、11-992、11-993、11-994、11-995、11-996、11-997、11-998、11-999、1200、1201、1202、1203、1204、1205、1206、1207、1208、1209、1210、1211、1212、1213、1214、1215、1216、1217、1218、1219、1220、1221、1222、1223、1224、1225、1226、1227、1228、1229、1230、1231、1232、1233、1234、1235、1236、1237、1238、1239、1240、1241、1242、1243、1244、1245、1246、1247、1248、1249、1250、1251、1252、1253、1254、1255、1256、1257、1258、1259、1260、1261、1262、1263、1264、1265、1266、1267、1268、1269、1270、1271、1272、1273、1274、1275、1276、1277、1278、1279、1280、1281、1282、1283、1284、1285、1286、1287、1288、1289、1290、1291、1292、1293、1294、1295、1296、1297、1298、1299、1300、1301、1302、1303、1304、1305、1306、1307、1308、1309、1310、1311、1312、1313、1314、1315、1316、1317、1318、1319、1320、1321、1322、1323、1324、1325、1326、1327、1328、1329、1330、1331、1332、1333、1334、1335、1336、1337、1338、1339、1340、1341、1342、1343、1344、1345、1346、1347、1348、1349、1350、1351、1352、1353、1354、1355、1356、1357、1358、1359、1360、1361、1362、1363、1364、1365、1366、1367、1368、1369、1370、1371、1372、1373、1374、1375、1376、1377、1378、1379、1380、1381、1382、1383、1384、1385、1386、1387、1388、1389、1390、1391、1392、1393、1394、1395、1396、1397、1398、1399、1400、1401、1402、1403、1404、1405、1406、1407、1408、1409、1410、1411、1412、1413、1414、1415、1416、1417、1418、1419、1420、1421、1422、1423、1424、1425、1426、1427、1428、1429、1430、1431、1432、1433、1434、1435、1436、1437、1438、1439、1440、1441、1442、1443、1444、1445、1446、1447、1448、1449、1450、1451、1452、1453、1454、1455、1456、1457、1458、1459、1460、1461、1462、1463、1464、1465、1466、1467、1468、1469、1470、1471、1472、1473、1474、1475、1476、1477、1478、1479、1480、1481、1482、1483、1484、1485、1486、1487、1488、1489、1490、1491、1492、1493、1494、1495、1496、1497、1498、1499、1500、1501、1502、1503、1504、1505、1506、1507、1508、1509、1510、1511、1512、1513、1514、1515、1516、1517、1518、1519、1520、1521、1522、1523、1524、1525、1526、1527、1528、1529、1530、1531、1532、1533、1534、1535、1536、1537、1538、1539、1540、1541、1542、1543、1544、1545、1546、1547、1548、1549、1550、1551、1552、1553、1554、1555、1556、1557、1558、1559、1560、1561、1562、1563、1564、1565、1566、1567、1568、1569、1570、1571、1572、1573、1574、1575、1576、1577、1578、1579、1580、1581、1582、1583、1584、1585、1586、1587、1588、1589、1590、1591、1592、1593、1594、1595、1596、1597、1598、1599、1600、1601、1602、1603、1604、1605、1606、1607、1608、1609、1610、1611、1612、1613、1614、1615、1616、1617、1618、1619、1620、1621、1622、1623、1624、1625、1626、1627、1628、1629、1630、1631、1632、1633、1634、1635、1636、1637、1638、1639、1640、1641、1642、1643、1644、1645、1646、1647、1648、1649、1650、1651、1652、1653、1654、1655、1656、1657、1658、1659、1660、1661、1662、1663、1664、1665、1666、1667、1668、1669、1670、1671、1672、1673、1674、1675、1676、1677、1678、1679、1680、1681、1682、1683、1684、1685、1686、1687、1688、1689、1690、1691、1692、1693、1694、1695、1696、1697、1698、1699、1700、1701、1702、1703、1704、1705、1706、1707、1708、1709、1710、1711、1712、1713、1714、1715、1716、1717、1718、1719、1720、1721、1722、1723、1724、1725、1726、1727、1728、1729、1730、1731、1732、1733、1734、1735、1736、1737、1738、1739、1740、1741、1742、1743、1744、1745、1746、1747、1748、1749、1750、1751、1752、1753、1754、1755、1756、1757、1758、1759、1760、1761、1762、1763、1764、1765、1766、1767、1768、1769、1770、1771、1772、1773、1774、1775、1776、1777、1778、1779、1780、1781、1782、1783、1784、1785、1786、1787、1788、1789、1790、1791、1792、1793、1794、1795、1796、1797、1798、1799、1800、1801、1802、1803、1804、1805、1806、1807、1808、1809、1810、1811、1812、1813、1814、1815、1816、1817、1818、1819、1820、1821、1822、1823、1824、1825、1826、1827、1828、1829、1830、1831、1832、1833、1834、1835、1836、1837、1838、1839、1840、1841、1842、1843、1844、1845、1846、1847、1848、1849、1850、1851、1852、1853、1854、1855、1856、1857、1858、1859、1860、1861、1862、1863、1864、1865、1866、1867、1868、1869、1870、1871、1872、1873、1874、1875、1876、1877、1878、1879、1880、1881、1882、1883、1884、1885、1886、1887、1888、1889、1890、1891、1892、1893、1894、1895、1896、1897、1898、1899、1900、1901、1902、1903、1904、1905、1906、1907、1908、1909、1910、1911、1912、1913、1914、1915、1916、1917、1918、1919、1920、1921、1922、1923、1924、1925、1926、1927、1928、1929、1930、1931、1932、1933、1934、1935、1936、1937、1938、1939、1940、1941、1942、1943、1944、1945、1946、1947、1948、1949、1950、1951、1952、1953、1954、1955、1956、1957、1958、1959、1960、1961、1962、1963、1964、1965、1966、1967、1968、1969、1970、1971、1972、1973、1974、1975、1976、1977、1978、1979、1980、1981、1982、1983、1984、1985、1986、1987、1988、1989、1990、1991、1992、1993、1994、1995、1996、1997、1998、1999、2000、2001、2002、2003、2004、2005、2006、2007、2008、2009、2010、2011、2012、2013、2014、2015、2016、2017、2018、2019、2020、2021、2022、2023、2024、2025、2026、2027、2028、2029、2030、2031、2032、2033、2034、2035、2036、2037、2038、2039、2040、2041、2042、2043、2044、2045、2046、2047、2048、2049、2050、2051、2052、2053、2054、2055、2056、2057、2058、2059、2060、2061、2062、2063、2064、2065、2066、2067、2068、2069、2070、2071、2072、2073、2074、2075、2076、2077、2078、207

19. 組織タンパク質を産生する方法であって、動物の組織に請求の範囲第1項に記載の質体細胞質膜ベクター・イニシエーション系を投与することを含む。ここで、該質体細胞質膜ベクター・イニシエーション系が、該動物の組織内への投入の際に発現する選択された異種ヌクレオチド配列を含む。方法。

20. パッケージングされたベクター・粒子を産生する方法であって、請求の範囲第1項に記載の質体細胞質膜ベクター・イニシエーション系をパッケージング細胞系統に導入することを含む。方法。

21. アルファウイルス構造タンパク質発現カセットであって、誘導性プロモーター及びアルファウイルス構造タンパク質遺伝子を含み、ここで該プロモーターは、細胞内で該プロモーターの発達の間にアルファウイルス構造タンパク質遺伝子の発現を制御し、そしてここで、細胞内の発達の間に、該発現カセットは、該発現カセットを含む細胞に對して細胞毒性であるのに十分な量の構造タンパク質を発現しない。発現カセット。

22. アルファウイルス構造タンパク質発現カセットであって、細胞内でウイルスDNAから細胞を脱離するウイルス複製のプロモーター・6、ホストウイルスDNAからアルファウイルスDNAの転写を誘導する5' 配列、1つ以上のアルファウイルス構造タンパク質遺伝子に発現可能に連結されるウイルス融合領域プロモーター、及びアルファウイルスRNAポリメラーゼ発現領域を含み、但し該カセットは、全てのアルファウイルス非構造タンパク質遺伝子の発現を抑制しない。アルファウイルス構造タンパク質発現カセット。

23. アルファウイルス構造タンパク質発現カセットであって、プロモーター及びアルファウイルス構造タンパク質遺伝子を含み、ここで該プロモーターが、該アルファウイルス構造タンパク質遺伝子の発現を制御し、但し該プロモーターは、アルファウイルスカプシドタンパク質遺伝子の発現を抑制しない。アル

#### アルファウイルス構造タンパク質発現カセット。

24. アルファウイルス構造タンパク質発現カセットであって、プロモーター及びアルファウイルス構造タンパク質遺伝子を含み、ここで該プロモーターが、該アルファウイルス構造タンパク質遺伝子の発現を制御し、但し該プロモーターは、アルファウイルス構造タンパク質遺伝子の発現を抑制しない。アルファウイルス構造タンパク質発現カセット。

25. アルファウイルス構造タンパク質発現カセットであって、プロモーター、アルファウイルス構造タンパク質遺伝子、及びリガンド配列を含み、ここで該プロモーターが、該アルファウイルス構造タンパク質遺伝子及びリガンド配列の発現を制御し、但し該プロモーターは、全てのアルファウイルス非構造タンパク質遺伝子の発現を抑制しない。アルファウイルス構造タンパク質発現カセット。

26. 請求の範囲第21項に記載の発現カセットであって、但し該プロモーターが全てのアルファウイルス非構造タンパク質遺伝子の発現を抑制しない。発現カセット。

27. 請求の範囲第23項に記載の発現カセットであって、但し該プロモーターが全てのアルファウイルス非構造タンパク質遺伝子の発現を抑制しない。発現カセット。

28. 請求の範囲第21項～第27項のいずれか1項に記載の発現カセットであって、ここで該アルファウイルス構造タンパク質遺伝子又は該タンパク質遺伝子が、ベクテリウム複製ウイルス由来である。発現カセット。

29. 請求の範囲第21項～第27項のいずれか1項に記載の発現カセットであって

て、ここで該アルファウイルス構造タンパク質遺伝子又は該タンパク質遺伝子が、ロスマンウイルス由来である。発現カセット。

30. 請求の範囲第21項～第27項のいずれか1項に記載の発現カセットであって、ここで該アルファウイルス構造タンパク質遺伝子又は該タンパク質遺伝子が、セムリキウイルス由来である。発現カセット。

31. 請求の範囲第21項～第27項のいずれか1項に記載の発現カセットであって、ここで該アルファウイルス構造タンパク質遺伝子又は該タンパク質遺伝子が、シンドビスウイルス由来である。発現カセット。

32. 請求の範囲第21項、第22項、第24項、第25項又は第26項のいずれか1項に記載の発現カセットであって、ここで該アルファウイルス構造タンパク質遺伝子が、アルファウイルスカプシドタンパク質をコードする。発現カセット。

33. 請求の範囲第21項、第22項、第23項、第25項、第26項又は第27項のいずれか1項に記載の発現カセットであって、ここで該アルファウイルス構造タンパク質遺伝子が、該タンパク質遺伝子又は該タンパク質遺伝子が、アルファウイルス構造タンパク質6、7及び8からなるグループの中から選択されるタンパク質をコードする。発現カセット。

34. 請求の範囲第21項、第24項、第25項又は第27項のいずれか1項に記載の発現カセットであって、ここで該カセットが、DNAカセットである。発現カセット。

35. 請求の範囲第22項、第23項、第24項、第25項、第26項又は第27項のいずれか1項に記載の発現カセットであって、ここで該プロモーターが、該タンパク質による該プロモーターの誘発の際に細胞内でタンパク質の発現を配

向する誘導性プロモーターである。発現カセット。

36. 請求の範囲第24項に記載の発現カセットであって、ここで該プロモーターが、メタリチン・イン、熱ショックタンパク質65、熱ショックタンパク質H5及びHSP70からなるグループの中から選択される。発現カセット。

37. 請求の範囲第24項に記載の発現カセットであって、ここで該プロモーターが、Drosophilaアンテナ・シグナル、SV40、SV、MSV、B6、JC、Molt、CMV及びAPMからなるグループの中から選択される。発現カセット。

38. 請求の範囲第23項又は第27項に記載の発現カセットであって、ここで該発現カセットが、RNA発現カセットである。発現カセット。

39. 請求の範囲第24項又は第26項に記載の発現カセットであって、ここで該発現カセットが、DNA発現カセットである。発現カセット。

40. 請求の範囲第23項に記載の発現カセットであって、ここで該プロモーターが、アルファウイルス融合領域である。発現カセット。

41. 請求の範囲第23項に記載の発現カセットであって、ここで該プロモーターが、アルファウイルス融合領域である。発現カセット。

42. 請求の範囲第21項～第27項のいずれか1項に記載の1つ以上のアルファウイルス構造タンパク質発現カセットを含む。配列。

43. 請求の範囲第1項に記載の配列であって、ここで該配列が、パッケージング領域であり、そしてここで該配列が、アルファウイルスベクター作成のための要に、該配列がアルファウイルス粒子を産生する。配列。

44. 組換え型アルファウイルス粒子を生成する方法であって、組換え型アルファウイルス粒子が生成されるように、組換え体の中へ、請求の範囲第21項、第22項、第26項、第27項のいずれか1項に記載のアルファウイルス構造タンパク質発現カセット、ならびにアルファウイルスベクター作原体、異体組換え型ベクター-インシエンション系、RNAベクター-インプリコン、及び組換えベクター粒子からなるグループの中から選択されるベクターを挿入することを含む、方法。

45. 請求の範囲第44項に記載の方法であって、組換え型アルファウイルス粒子を組換え体から回収する工程をさらに含む、方法。

46. 組換え型アルファウイルス粒子を生成する方法であって、組換え型アルファウイルス粒子が生成されるように、組換え体の中へ、(a) 請求の範囲第23項又は第27項に記載のアルファウイルス構造タンパク質発現カセット、(b) アルファウイルスベクター作原体、異体組換え型ベクター-インシエンション系、RNAベクター-インプリコン及び組換えベクター粒子からなるグループの中から選択されるベクター、ならびに(c) プロモーター及びアルファウイルスカプシド遺伝子を含有するカセットであって、ここで該プロモーターが、アルファウイルスカプシド遺伝子の発現を駆動し、但し該プロモーターはアルファウイルス構造タンパク質遺伝子の発現を駆動しない、発現カセット、を挿入することを含む、方法。

47. 請求の範囲第46項に記載の方法であって、組換え体から組換え型アルファウイルス粒子を回収する工程をさらに含む、方法。

48. 組換え型アルファウイルス粒子を生成する方法であって、組換え型アルファウイルス粒子が生成されるように、組換え体の中へ、(a) 請求の範囲第23項に記載のアルファウイルス構造タンパク質発現カセット、(b) アルファウイルスベクター作原体、異体組換え型ベクター-インシエンション系、RNA

ベクター-インプリコン及び組換えベクター粒子からなるグループの中から選択されるベクター、ならびに(c) プロモーター及びアルファウイルスカプシド遺伝子を含有する発現カセットであって、ここで該プロモーターが、アルファウイルスカプシド遺伝子の発現を駆動し、但し該プロモーターはアルファウイルス構造タンパク質遺伝子の発現を駆動しない、発現カセット、を挿入することを含む、方法。

49. 請求の範囲第48項に記載の方法であって、組換え体から組換え型アルファウイルス粒子を回収する工程をさらに含む、方法。

50. アルファウイルスベクター作原体であって、RNAの合成をウイルスcDNAからインビトロ転写のプロセスによって開始するウイルスcDNAのプロモーター5'、続いてアルファウイルスRNAの転写を開始する5'配列、続いてアルファウイルス非構造タンパク質をコードするヌクレオチド配列、サブゲノミックフラグメントのウイルス転写が妨げられるように不活性化されたウイルス複製領域、隣接するリーディングフレームの間のリボソーム結合部位を促進する内添リボソーム侵入部位又は配列、及びアルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列を含む、アルファウイルスベクター作原体。

51. アルファウイルスベクター作原体であって、RNAの合成をウイルスcDNAからインビトロ転写のプロセスによって開始するウイルスcDNAのプロモーター5'、続いてアルファウイルスRNAの転写を開始する5'配列、続いてアルファウイルス非構造タンパク質をコードするヌクレオチド配列、サブゲノミックフラグメントのウイルス転写が減少されるように修正されたウイルス複製領域、隣接するリーディングフレームの間のリボソーム結合部位を促進する内添リボソーム侵入部位又は配列、及びアルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列を含む、アルファウイルスベクター作原体。

52. アルファウイルスベクター作原体であって、RNAの合成をウイルスcDNAから

インビトロ転写のプロセスによって開始するウイルスcDNAのプロモーター5'、続いてアルファウイルスRNAの転写を開始する5'配列、続いてアルファウイルス非構造タンパク質をコードするヌクレオチド配列、サブゲノミックフラグメントのウイルス転写が妨げられるように不活性化されたウイルス複製領域、サブゲノミックフラグメントのウイルス転写が減少されるように修正されたウイルス複製領域、隣接するリーディングフレームの間のリボソーム結合部位を促進する内添リボソーム侵入部位又は配列、及びアルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列を含む、アルファウイルスベクター作原体。

53. アルファウイルスcDNAベクター作原体であって、RNAの合成を細胞内でウイルスcDNAから開始するウイルスcDNAのプロモーター5'、続いてアルファウイルスRNAの転写を開始する5'配列、続いてアルファウイルス非構造タンパク質をコードするヌクレオチド配列、(d) (1) 全ての既存なウイルス複製領域、(2) サブゲノミックフラグメントのウイルス転写が減少されるように修正されたウイルス複製領域、及び(3) サブゲノミックフラグメントのウイルス転写が妨げられるように不活性化されたウイルス複製領域、隣接するリーディングフレームの間のリボソーム結合部位を促進する内添リボソーム侵入部位又は配列、及びアルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列を含む、アルファウイルスcDNAベクター作原体。

54. アルファウイルスcDNAベクター作原体であって、RNAの合成を細胞内でウイルスcDNAから開始するウイルスcDNAのプロモーター5'、続いてアルファウイルスRNAの転写を開始する5'配列、アルファウイルス非構造タンパク質をコードするヌクレオチド配列、サブゲノミックフラグメントのウイルス転写が妨げられるように不活性化されたウイルス複製領域、続いてサブゲノミックフラグメントのウイルス転写が減少されるように修正された第2のウイルス複製領域、及びアルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列を含む、アルファウイルスcDNAベクター作原体。

55. ポリアデニル化配列をさらに含む、請求の範囲第50項～第54項のいずれか1項に記載のベクター作原体。

56. 請求の範囲第50項～第54項のいずれか1項に記載のベクター作原体であって、ここで組換え型アルファウイルスが、ペキズエウマ属ウイルス、コス・リバーウイルス及びセムキキ森林ウイルスからなるグループの中から選択される、ベクター作原体。

57. 組換え型アルファウイルスがシンドビスウイルスである、請求の範囲第50項～第54項のいずれか1項に記載のベクター作原体。

58. 請求の範囲第50項～第54項のいずれか1項に記載のベクター作原体であって、選択された異種ヌクレオチド配列をさらに含む、ベクター作原体。

59. 請求の範囲第58項に記載のベクター作原体であって、ここで該ベクター作原体が、約100塩基～約2000塩基のサイズの範囲で選択された異種ヌクレオチド配列を含む、ベクター作原体。

60. 請求の範囲第58項に記載のベクター作原体であって、ここで前記選択された異種ヌクレオチド配列が、1L-1E、1L-1E及び4E-CSFからなるグループの中から選択されたタンパク質をコードする配列である、ベクター作原体。

61. 請求の範囲第58項に記載のベクター作原体であって、ここで前記選択された異種ヌクレオチド配列が、1L-1Eである、ベクター作原体。

62. 請求の範囲第58項に記載のベクター作原体であって、ここで前記選択された異種ヌクレオチド配列が、インフルエンザウイルス、A型ウイルス、B型、H1V、H2V、F1V、F2V、H3V-1、H1V-1、H2V-1、H3V-1からなるグループの中から選択されたウイルスから得られる、ベクター作原体。





[illegible]

70. 請求の範囲第5.2項又は第5.4項に記載のベクター作成体であって、Δ<sup>+</sup>フレイズ3.3遺伝子又はINV<sup>+</sup>3201遺伝子をさらに含む、ベクター作成体。
71. 前2の範囲第5.2項又は第5.4項に記載のベクター作成体であって、非アルファウイルスパッケージング配列をさらに含む、ベクター作成体。
72. 請求の範囲第5.2項又は第5.4項に記載のベクター作成体であって、3'転写終止配位をさらに含む、ベクター作成体。
73. 請求の範囲第1.2項に記載のベクター作成体であって、ここで前記転写終止配位が、 $\lambda$ 因子ホロゲノムに由来する、ベクター作成体。

61. 哺乳動物でない細粒から培養される。胚乳の匍匐花 7 9 年に記載のバック  
ジング細胞系統。

83. 初に足生翅羽が枝材である、請求の範囲第 81 項に元設のパッケージング  
系図系統。

- ※1. 請求の範囲第7項に出発のパッケージング細胞系統であって、これに該パッケージング細胞系統が、ベクター作成性の導入の手段で、ヒト細胞を感染するアルファウイルス粒子を産生する、パッケージング細胞系統。

85. 請求の範囲系79項に記載のパッケージング処理系統であって、ここでアルファツイル系樹脂タンパク質が、産生されない、パッケージング処理系統。

16. アルファウイルススペクターのバックージング及び再生に適したバックージング複製系統であって、ここではバックージング細胞系統が、189-Cの芽殖を志向する発現カセットを含む、バックージング複製系統。

27. 請求の範囲第9段に記述のパッケージング機能系統であって、1つ以上のフルファイルシステム基幹パッケージの実態を記述する説明カセットをさらに含む、パッケージング機能系統。

88. 請求62項を第79項〜第86項に記載のパッケージング制御系統であって、  
 にて種別系統が、アボーツスを制御する頂伝子信号を生成する、パッ  
 ケージング制御系統。

19. 請求の趣意第 8 8 項に記述のパッケージング梱包系統であって、ここで前記

14. 細胞型アルファウイルスは皮下で、細胞組織内への導入の時点で、感染後少なくとも72時間生存可能な感染細胞を産生する。細胞型アルファウイルスは、

15. 痘状ウイルスはアルファウイルス属下であって、動物組織内への導入の特点で、感染宿主となく72時間生存力があり感染細胞を発生し、送付に適合、アルファウイルス科での感染を受けた標的細胞内で少なくとも1つの複製芽はそれに増殖された形態の発現を強くペクター型産生をも促しており、二度接種時にはその複製された形態が動物内で免疫応答を叫喚させ、痘状ウイルスをアルファウイルスとす。

76. 宿主の細胞膜より核に核酸の挿入型アルファウイルス粒子であって、この  
で誘発された抗原が、細胞媒介免疫応答、HLAクラスI 制限免疫応答、  
及びHLAクラスII 制限免疫応答ならなるグループの中から選択される免疫  
応答を誘起する、複製型アルファウイルス粒子。

77. 請求の範囲第74項～第76項のいずれか1項に記載の汎用型アルファ2  
イルス粒子を用いて、感染された細胞。

78. 請求の範囲第77項に記載の細孔であって、ここで該細孔が、哺乳動物細胞である、細胞、

79. アルファウイルス構造タンパク質を誘導性に発現するパッケージング細胞系  
株であつて、そしてアルファウイルスベクター作成体の考入の際に、結核  
型アルファウイルス粒子を生成する。パッケージング細胞系株。

80. 哺乳動物紅血球から誘導される、請求の範囲第79項に記載のパッケージング  
組成物。

- 遺伝子産物が、bc1-2 オゾン破壊因子、J9-kDタンパク質をコードするアデノウイルスE3遺伝子、1番単純ヘルペスウイルス、タンパク質34.5遺伝子、及びE6/E7パピリヌウイルスE6遺伝子からなるグループの4から選択される遺伝子によってコードされる、バックシーキング細胞系統。

90. アルファウイルスは包膜を有するウイルスであり、結核の病原菌は9項に示すの**パッケージング**の過程、**並びに**アルファウイルスウィルスベクター**の**生成体**又は**アルファウイルスの**DNA**ベクター**の**生成体を含む、この2者は**必ず**細胞内**で**、**新**核**内**でアルファウイルス粒子を生成する。アルファウイルスは**生**産者細胞内**に**。

2. 前述の細胞系90株に多数のアルファウイルス生体増殖系統であつて、こゝで初代増殖系型アルファウイルス株が、この細胞を感染する、アルファウイルス生体増殖系統。

22. 請求の範囲の第5項には、核膜のアルファウイルス生産系即ち系統であって、こ  
こで発生要素複製系統が、複製後母アルファウイルス粒子を該宿主に感染す  
る、アルファウイルス生産系細胞系統。

33. 請求の根拠は90項に記述のアルファウイルス生産者細胞系統であって、こ  
こで生産者細胞系統が、宿主動物細胞系統の分化状態に依存して複製する  
アルファウイルス約子を生産する、アルファウイルス生産者細胞系統。

- 9) 感染したアルファウイルス株子のパッケージング及び5年以内に消したものを材料  
の示されて、ここに核生着細胞系が、 $msb/ps$  の出現を指向する選  
別セット、 $msb$  の出現を指向する選別セット、及びヒトウイルスパッ  
ッケージング剤を含むアルファウイルスベクター作成体系を、牛痘細胞系  
面。

95. 細胞内型アルファウイルス粒子のパッケージング及び感染に用いた生産者細胞系統であって、ここで細胞内型が、非アルファウイルス増殖タンパク質の発現を制御する1つ以上の遺伝子セット、及び非アルファウイルス増殖タンパク質が誘導されるウイルスに由来するパッケージング配列を含むアルファウイルスベクター作成体を含む、生産者細胞系統。

96. パッケージング細胞系から細胞内型アルファウイルス粒子を生産するための方法であって、該方法は、アルファウイルスベクター作成体を宿主の細胞（第70項-第90項のいずれか1項に記述するパッケージング細胞系に、以下（1）若しくは細胞内型ベクターイニシエーション系を用いたパッケージング細胞系）のトランスフェクション、（1）インビトロでアルファウイルスベクター作成体から誘導されるRNAを用いたパッケージング細胞系（トランスフェクション、及び（1））細胞内型アルファウイルス粒子を用いたパッケージング細胞系（細胞内型）の両方）のいずれかから選択されるプロセスによって導入することを含む、方法。

97. 動物に与える抗原に対する免疫応答を刺激する方法であって、アルファウイルスでの感染を受けた細胞内型で少なくとも1つの抗原又はその修正された形態の抗原を含むベクターを含む細胞内型アルファウイルス粒子で、感染性のある動物細胞を感染させることを含む、ここで細胞内型又はその修正された形態が動物内での免疫応答を誘導し、そしてここで細胞内型アルファウイルス粒子は、アルファウイルス増殖タンパク質を発現する宿主細胞に感染された細胞系（ベクターを含むアルファウイルスパッケージング細胞系）から得られ、アルファウイルスベクター作成体の導入後に、細胞内型アルファウイルス粒子を用いる、方法。

98. 細胞内型ウイルス粒子である、請求の範囲第97項に記載の方法。

99. 請求の範囲第98項に記載の方法であって、ここで細胞内型ウイルス粒子が、イ

ンフルエンザウイルス粒子を含む、方法。

106. 請求の範囲第97項から第105項のいずれか1項に記載の方法であって、ここで細胞内型細胞は、細胞内型で感染を受ける、方法。

107. 請求の範囲第97項から第105項のいずれか1項に記載の方法であって、ここで細胞内型細胞は、細胞内型で感染を受ける、方法。

108. 動物における抗原への免疫応答を刺激する方法であって、感染性のある細胞内型で感染を受けた細胞内型で少なくとも1つの抗原又はその修正された形態の抗原を含むベクターを含む細胞内型アルファウイルス粒子で、感染性のある動物細胞を感染させることを含む、ここで細胞内型又はその修正された形態が動物内での免疫応答を誘導し、そしてここで細胞内型アルファウイルス粒子は、細胞内型アルファウイルス増殖タンパク質を発現する宿主細胞に感染された細胞系（ベクターを含むアルファウイルスパッケージング細胞系）から得られ、アルファウイルスベクター作成体の導入後に、細胞内型アルファウイルス粒子を用いる、方法。

109. 細胞内型ウイルス粒子である、請求の範囲第108項に記載の方法。

110. 請求の範囲第108項に記載の方法であって、ここで細胞内型細胞は、細胞内型で感染を受ける、方法。

111. 請求の範囲第108項に記載の方法であって、ここで細胞内型細胞は、細胞内型で感染を受ける、方法。

112. 請求の範囲第108項に記載の方法であって、ここで細胞内型細胞は、細胞内型で感染を受ける、方法。

ンフルエンザウイルス、腺ウイルス、HPV、HSV、HIV、H5N1、FIV、HTLV-1、HIV-2及びHIV-3からなるグループの中から選択されるウイルスから得られる、方法。

100. 請求の範囲第98項に記載の方法であって、ここで細胞内型ウイルス粒子が、細胞内型ウイルス粒子である、方法。

101. 請求の範囲第97項に記載の方法であって、ここで細胞内型細胞は、細胞内型で感染を受ける、方法。

102. 請求の範囲第97項に記載の方法であって、ここで細胞内型細胞は、細胞内型で感染を受ける、方法。

103. 請求の範囲第97項に記載の方法であって、ここで細胞内型アルファウイルスベクター作成体が、細胞内型で感染を受けた細胞内型で少なくとも1つの抗原又はその修正された形態の抗原を含むベクターを含む細胞内型アルファウイルス粒子で、感染性のある動物細胞を感染させることを含む、ここで細胞内型又はその修正された形態が動物内での免疫応答を誘導し、そしてここで細胞内型アルファウイルス粒子は、細胞内型アルファウイルス増殖タンパク質を発現する宿主細胞に感染された細胞系（ベクターを含むアルファウイルスパッケージング細胞系）から得られ、アルファウイルスベクター作成体の導入後に、細胞内型アルファウイルス粒子を用いる、方法。

104. 請求の範囲第97項に記載の方法であって、ここで細胞内型アルファウイルスベクター作成体が、細胞内型で感染を受けた細胞内型で少なくとも1つの抗原又はその修正された形態の抗原を含むベクターを含む細胞内型アルファウイルス粒子で、感染性のある動物細胞を感染させることを含む、ここで細胞内型又はその修正された形態が動物内での免疫応答を誘導し、そしてここで細胞内型アルファウイルス粒子は、細胞内型アルファウイルス増殖タンパク質を発現する宿主細胞に感染された細胞系（ベクターを含むアルファウイルスパッケージング細胞系）から得られ、アルファウイルスベクター作成体の導入後に、細胞内型アルファウイルス粒子を用いる、方法。

105. 動物において抗原への免疫応答を刺激する方法であって、アルファウイルスでの感染を受けた細胞内型で少なくとも1つの抗原又はその修正された形態の抗原を含むベクターを含む細胞内型アルファウイルス粒子で、感染性のある動物細胞を感染させることを含む、ここで細胞内型又はその修正された形態が動物内での免疫応答を誘導し、そしてここで細胞内型アルファウイルス粒子は、細胞内型アルファウイルス増殖タンパク質を発現する宿主細胞に感染された細胞系（ベクターを含むアルファウイルスパッケージング細胞系）から得られ、アルファウイルスベクター作成体の導入後に、細胞内型アルファウイルス粒子を用いる、方法。

細胞内型で感染を受けた細胞内型で少なくとも1つの抗原又はその修正された形態の抗原を含むベクターを含む細胞内型アルファウイルス粒子で、感染性のある動物細胞を感染させることを含む、ここで細胞内型又はその修正された形態が動物内での免疫応答を誘導し、そしてここで細胞内型アルファウイルス粒子は、細胞内型アルファウイルス増殖タンパク質を発現する宿主細胞に感染された細胞系（ベクターを含むアルファウイルスパッケージング細胞系）から得られ、アルファウイルスベクター作成体の導入後に、細胞内型アルファウイルス粒子を用いる、方法。

113. 請求の範囲第108項に記載の方法であって、ここで細胞内型細胞は、細胞内型で感染を受ける、方法。

114. 請求の範囲第108項に記載の方法であって、ここで細胞内型細胞は、細胞内型で感染を受ける、方法。

115. 請求の範囲第108項に記載の方法であって、ここで細胞内型細胞は、細胞内型で感染を受ける、方法。

116. 請求の範囲第108項に記載の方法であって、ここで細胞内型細胞は、細胞内型で感染を受ける、方法。

117. 請求の範囲第108項に記載の方法であって、ここで細胞内型細胞は、細胞内型で感染を受ける、方法。

118. 請求の範囲第108項に記載の方法であって、ここで細胞内型細胞は、細胞内型で感染を受ける、方法。



が、HBVから得られる、方法、

119. 請求の項図第1.08項に記載の方法であって、ここで前記第1項の配列が、HCVから得られる、方法。

175. ・結晶の結晶形 108 項に記載の方法であって、ここで初位界は結晶形が、HSV から得られる、方法。

12. 反転複製型バクテリオファージニシエンマン系であって、感受性のある標的細胞内ではCNAからPNAの5'から3'合成を開始する逆方向にRNAの合成はプロモーターを介する、ここでPNAは、自発的に複製を強く増殖し、二重鎖状態を形成するバクテリオファージ性成分を含む。該複製複合体は、動物宿主細胞に感染する細胞内ではその特正された複製状態をコードする、真核細胞型バクテリオニシエンマン系。

177. 計測の短所(第1)2)1)項に記載の日本情報風見ベクター・インシエーション  
法であつて、ここで、前記程度された状態が、状態を介した伝送、用クラ  
ス1、制御伝送伝送及び2)1)クラスに、材料伝送伝送からなるグループの中心  
から伝送される伝送が著しく短縮する、長短制御風見ベクター・インシエーション  
法。

123. 野矢の河川第12: 項に記載の真核細胞原形質ベクター・イニシエーション系であった。ここで脂質プロモーターが、ENV台座のRNAプロモーターである。真核細胞原形質ベクター・イニシエーション系。

124. 宿主の英田第121治に、我がの炭疽菌と草草ベクターイニシエーション系であつて、ここで複製中で自律的に増殖する動記ベクター作成体が、5'プロモーターが強くアルファウイルス5'の巨核を成核する能力、アルファウイルス外核タンパク質をコードする核酸配列、アルファウイルスRNAが

びびりからなるグループの中から選択されるウイルスから得られる、互換性  
複製ベクターイニシエーション系。

120. 請求の項を第 2 項に同様の異位相座標ベクターイニシエーション系であつて、ここで前記異位相座標列が、HBY から与られる。異位相座標ベクターイニシエーション系。

23). 両米の稲産第1・21区に採取の点検細胞液濃縮ベクターイニシエーション系であつて、ここで所記系種株の配列が、HCVから得られる、同株細胞液濃縮ベクターイニシエーション系。

12. 請求の範囲第121項に定義の両相相重係ベクタ・イニシエーション  
系であって、ここで所記相重係配列が、RSYから得られる、両相相重係  
ベクタ・イニシエーション系。

13. 虹模大型アルファウイルスに感染して、以下：

(10) 異性核酸分子の発現を制御するアルファウイルスベクター性原体であって、ここで該アルファウイルスベクター性原体が、以下 (i)、 $\beta$ -アルファウイルスコードの転写を開始する5' 配列、(ii) アルファウイルス非特異性タンパク質をコードするメタレオラゼ配列、(iii) 異性核酸分子の発現を制御するウイルス様内部プロモーター、及び (iv) RNAポリメラーゼ認識序列、を含むアルファウイルスベクター性原体であって、ここで該異性核酸分子がアルファウイルス様タンパク質発現に有用な配列として

(c) 該アルファウイルスベクター<sup>(1)</sup>或は該アルファウイルス<sup>(2)</sup>は異なる第2のウイルス由来のエンベロープタンパク質を含む、非複製型アルファウイルス<sup>(3)</sup>。

134. 陸軍の初編纂に33項に記載の題名を型アシフツウイスル例として、

リメラー・ザンツの例、及び $\beta$ -ホリアデニル化区域を含む、真核細胞原核ヘ  
シター・ニシエーションズ。

125. 請求の範囲第121項に記載の異性化装置用ベクターニシエーション系であって、脂質終了配子がさらに含む、異性化装置用ベクターニシエーション系。

126. 結核の細菌第123号に記載の炭疽補助菌はペクター・イニシエーション系であつて、ここで菌中で自体的に制御する阻却ペクター-作原体が、ポリウーグルス、ライノウーグルス、コグセンキウーグルス、鼠疫、炭疽、35S、No.1及びNo.2のウイルスからなるグループの中から選択されるウイルスから誘導される。炭疽補助菌はペクター・イニシエーション系。

127. 伝束の動物群1と1項に属する鳥類は鳥類群ベクター・イニシエーション系であって、ここで細胞中で自然的に増殖する前記ベクター遺伝子が、トバモウイルス、ボクモウイルス及びプロモウイルスからなるグループの中から選択されるウイルスから伝束される。また細胞系群ベクター・イニシエーション系。

129. 紡織の振動等 2.1項に引く真珠粉の組成はベククイニシエーション系であつて、主成分はベククイニターが、MoTiプロモーター、マンガンオキシプロモーター、グルココリンゴインヒビター、SV10プロモーター、CEV 315プロモーター、ノバリンシンターゼプロモーター及びCEVプロモーターからなるグループの中から選択される、真珠粉組成ベククイニシエーション。

129. 阪神の電車第121号に感染の森林細胞癌症ベクター-イニシエーション  
系であって、ここで前記森林細胞癌病が、インソルユンザウイルス、25ウイ  
ルス、JMV、ERV、JIV、FeLV、FIV、ハンタウイルス、HTLV-1、MILV、JMA

ここで前記カプシドが、アルファウイルスカプシドである、相換え型アルファウイルス様子。

35. 豚舎の飼育用188項に記載の施設用型アルファウイルス疫子であって、ここで施設用アルファウイルスベクターが、セムリヤ線粒体ウイルス、ベネズエララウマ腸炎ウイルス、及びロス・リバーウイルスからなるグループの中から選択されるアルファウイルスから発生される。施設用型アルファウイルス疫子

116. 前述の同田勝 193 号に記載の増殖型アルファウイルス様子であって、ここで細胞アルファウイルスベクターが、シンドビスウイルスから産生される、相換え型アルファウイルス加下。

121. 12本の断断DNA 3.8 kbに3本の断断入型アルファウイルス様子で、ここで前記ベクター1本が、前記2本のウイルス由来のRNAパッケージングシグナルをさらに含む、断断入型アルファウイルス様子。

118. 研究の第四章137項に記述の移転型アルファウイルス様子であって、ここで前記のバリエーションが、コロナウイルス、エンテロウイルス又は腺ウイルス由来である。細粒型アルファウイルス様子。

19. 請求の範囲第139項に記載の抽込用アルファウイルス様子であって、ここで前記第2のウイルスが、前記アルファウイルスベクター（作原体）とは異なるアルファウイルスである、抽込用アルファウイルス状。

14. 防衛の時間短縮に有効に配賦の指針を、アルファウイルスに基づいて、  
ここで配賦インベロープ類タンパク質が、ヤムジヤ系統のウイルス、ベズエ  
エワマ系統ウイルス及びロス・リバーウイルスからなるグループの中から選  
び出されるアルファウイルスから得られる、複製型アルファウイルス株。

141. 前記エンベロープタンパク質が、センドビスウイルスから得られる。  
請求の範囲第133項に記載の組換え型アルファウイルス疫学。

142. 前記第2のウイルスが、水痘性ヘルペスウイルスである。請求の範囲第133項に記載の組換え型アルファウイルス疫学。

143. 前記第2のウイルスが、コロナウイルス、レトロウイルス又は痘苗ウイルスである。請求の範囲第133項に記載の組換え型アルファウイルス疫学。

144. 以下の組換えタンパク質を生成するための方法であって、適切な培養条件下で、組換えタンパク質の発現を可能にする宿主で、複製型組換えベクターイニシエーション系で培養された細胞又はトランスフェクト細胞、単離された培養細胞又は宿主細胞を培養させることを含む。

ここで、複製型組換えベクターイニシエーション系が、複製型内でDNAからRNAの5'から3'合成を開始するRNAウイルスDNAの複製性プロモーターを含む。ここでRNAが、複製型内で自発的に増殖しかつ複製性配列を形成するベクターを含む。複製型組換えタンパク質をコードし、そしてここで複製型で自発的に増殖するベクターが、アルファウイルスRNAの転写を開始する配列、アルファウイルス複製タンパク質をコードする複製配列、及びアルファウイルスRNAポリメラーゼ複製型を含む。  
方法。

145. 単離された培養細胞又は宿主細胞へ複製性配列を戻すための方法であって、複製型組換えタンパク質を複製型組換えベクターイニシエーション系で培養する工程を含む。  
ここで、複製型組換えベクターイニシエーション系が、複製型内でDNAからRNAの5'から3'合成を開始するRNAウイルスDNAの複製性プロモーター

CSFからなるグループの中から選択される。方法。

146. 請求の範囲第144項又は第145項に記載の方法であって、ここで前記複製型組換えタンパク質が、ウイルス、細菌由来の抗原、動物由来の抗原及び哺乳動物由来の抗原からなるグループの中から選択される。方法。

147. 請求の範囲第142項に記載の方法であって、ここで前記ウイルス抗原が、インフルエンザウイルス、RSウイルス、EPR、HCV、EBV、FIV、RST、FELV、FIV、ハンタウイルス、HTLV-1、HTLV-2及びBorna病ウイルスからなるグループの中から選択されるウイルスから得られる。方法。

148. 請求の範囲第144項又は第145項に記載の方法であって、ここで前記複製型組換えタンパク質が、複製型組換えタンパク質を複製型組換えベクターイニシエーション系で培養する工程を含む。  
方法。

149. 請求の範囲第144項又は第145項に記載の方法であって、ここで前記複製型組換えベクターイニシエーション系が、複製型組換えタンパク質を複製型組換えベクターイニシエーション系で培養する工程を含む。  
方法。

150. 請求の範囲第144項又は第145項に記載の方法であって、ここで前記複製型組換えベクターイニシエーション系が、複製型組換えタンパク質を複製型組換えベクターイニシエーション系で培養する工程を含む。  
方法。

151. 請求の範囲第150項に記載の方法であって、ここで前記複製型組換えベクターイニシエーション系が、複製型組換えタンパク質を複製型組換えベクターイニシエーション系で培養する工程を含む。  
方法。

5'を含む。ここでRNAが、複製型で自発的に増殖しかつ複製性配列を形成するベクターを含む。複製型組換えタンパク質をコードし、そしてここで複製型で自発的に増殖するベクターが、アルファウイルスRNAの転写を開始する配列、アルファウイルス複製タンパク質をコードする複製配列、及びアルファウイルスRNAポリメラーゼ複製型を含む。  
方法。

152. 請求の範囲第144項又は第145項に記載の方法であって、ここで前記複製型組換えタンパク質が、複製型組換えタンパク質を複製型組換えベクターイニシエーション系で培養する工程を含む。  
方法。

153. 請求の範囲第144項又は第145項に記載の方法であって、ここで前記複製型組換えタンパク質が、複製型組換えタンパク質を複製型組換えベクターイニシエーション系で培養する工程を含む。  
方法。

154. 請求の範囲第144項又は第145項に記載の方法であって、ここで前記複製型組換えタンパク質が、複製型組換えタンパク質を複製型組換えベクターイニシエーション系で培養する工程を含む。  
方法。

155. 請求の範囲第144項又は第145項に記載の方法であって、ここで前記複製型組換えタンパク質が、複製型組換えタンパク質を複製型組換えベクターイニシエーション系で培養する工程を含む。  
方法。

156. 請求の範囲第144項又は第145項に記載の方法であって、ここで前記複製型組換えタンパク質が、複製型組換えタンパク質を複製型組換えベクターイニシエーション系で培養する工程を含む。  
方法。

157. 請求の範囲第150項に記載の方法であって、ここで前記複製型組換えベクターイニシエーション系が、複製型組換えタンパク質を複製型組換えベクターイニシエーション系で培養する工程を含む。  
方法。

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**